UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTE MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1967 — N° 2

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE DU POUVOIR ANTHELMINTHIQUE DE NOUVEAUX DÉRIVÉS DU DIPHÉNYL-MÉTHANE

THÈSE POUR LE DOCTORAT EN PHARMACIE

Mention "Etat"

présentée et soutenue publiquement le ~~mercredi 22 février 1967~~ 27 mars 1967

PAR

Bernard AMYOT

né à Pau (Basses-Pyrénées), le 14 janvier 1940

Examinateurs de la thèse :

MM. J. BAILENGER, Professeur ..... *Président*

G. VITTE, Professeur ..... *Juges*

R. PAUTRIZEL, Professeur ..... *Juges*

1967

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1937 — N°

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE DU POUVOIR ANTHELMINTHIQUE DE NOUVEAUX DÉRIVÉS DU DIPHÉNYL-MÉTHANE

Thèse

pour

THÈSE POUR LE DOCTORAT EN PHARMACIE

(Diplôme d'État)

présentée et soutenue publiquement le Samedi 27 Mars 1937

par

Bernard AMYOT

né à Puy-Guillaume (Puy-de-Dôme), le 14 février 1910

Président	MM. J. BARLOCCO, Professeur	
Juges	G. VITTE, Professeur	DIRECTEUR DE THÈSE
	F. DAUTREBANDE, Professeur	

1937

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTE MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1967 — N°

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE DU POUVOIR ANTHELMINTHIQUE DE NOUVEAUX DÉRIVÉS DU DIPHÉNYL-MÉTHANE

THÈSE POUR LE DOCTORAT EN PHARMACIE

Mention "Etat"

présentée et soutenue publiquement le mercredi 22 février 1967

PAR

Bernard AMYOT

né à Pau (Basses-Pyrénées), le 14 janvier 1940

Examinateurs de la thèse :

MM. J. BAILENGER, Professeur ..... *Président*

G. VITTE, Professeur ..... *Juges*

R. PAUTRIZEL, Professeur ..... *Juges*

1967

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A MA FEMME

A MA FAMILLE

A NOS MAITRES

DE LA FACULTE DE MEDECINE

ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX.

AVANT PROPOS

Avant d'exposer les résultats de nos recherches, nous tenons à remercier ici tous ceux qui nous ont aidé et manifesté leur intérêt au cours de la réalisation de cette thése et dans nos études.

Nos plus vifs remerciements vont tout d'abord à notre Maître et Président de thèse, Monsieur le Professeur BAILENGER, pour le travail particulièrement intéressant qu'il nous a confié et la constante attention avec laquelle il l'a dirigé. Nous lui sommes profondément reconnaissant pour l'aide et les conseils qu'il nous a toujours prodigués avec beaucoup de dévouement, de compétence et de dynamisme dans une discipline à laquelle il nous a initié. Qu'il trouve ici l'expression de notre plus sincère gratitude.

Monsieur le Professeur PAUTRIZEL nous a toujours manifesté son intérêt et ses encouragements. Il nous a accueilli avec bienveillance dans son Laboratoire et a mis à notre disposition ses locaux et son matériel pour la réalisation de ce travail. Nous sommes heureux de pouvoir ici l'en remercier et lui exprimer toute notre reconnaissance.

Nous adressons enfin un grand merci aux membres du Laboratoire de Zoologie et Biologie Animale pour l'aide qu'ils nous ont apportée dans ce travail.

ETUDE EXPERIMENTALE
DU POUVOIR ANTHELMINTHIQUE
DE NOUVEAUX DERIVES DU
DIPHENYL-METHANE

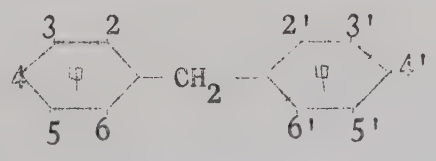
- INTRODUCTION -

Le parasitisme par les Helminthes revêt dans le monde une importance considérable. CAVIER (10), se basant sur les statistiques fournies par STOLL (1947), estime à environ 800 millions le nombre des sujets infestés, soit plus du tiers de la population totale du globe terrestre.

Cette importance justifie le grand nombre de travaux consacrés de longue date à la découverte et à l'étude pharmacologique des substances naturelles ou synthétiques douées de propriétés anthelminthiques. Actuellement, les progrès de la synthèse chimique ont mis à notre disposition un nombre considérable de produits préconisés dans le traitement de ces parasitoses ; mais, comme de nombreux auteurs le soulignent, parmi l'extrême diversité de ces composés, seuls quelques-uns se révèlent intéressants du point de vue de leur efficacité ou de leur index chimiothérapique.

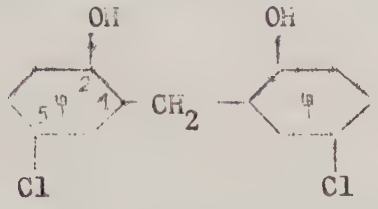
Ce déséquilibre entre les recherches et les résultats ne pourra être réduit que par une étude rationnelle des anthelminthiques. Or celle-ci implique, essentiellement, une connaissance de plus en plus approfondie des rapports existant entre la constitution chimique et l'activité parasiticide des composés étudiés.

Parmi cet ensemble de recherches, nous avons retenu les travaux relativements récents consacrés à certains dérivés halogénés du diphénylméthane qui possèdent d'intéressantes propriétés ténicides.



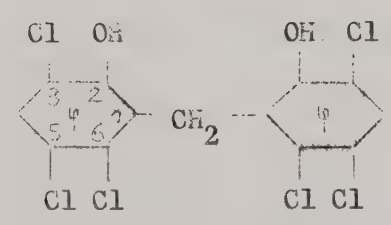
Diphényl-méthane

CRAIGE et KLECKNER (16) mettent en évidence, en 1946, l'action du "diphenthane - 70" (2,2', dihydroxy, 5,5', dichlorodiphényl-méthane) sur Taenia pisiformis et Dypilidium caninum, chez le chien.



"diphenthane - 70" = "G4" = "Dichlorophène"

Quelques années plus tard, les résultats obtenus par RYFF et ses collaborateurs (47,48), puis par BURCH et BLAIR (8), respectivement sur des Cestodes parasites du mouton et du chat, confirment l'activité de ce composé. KERR (33) reconnaît également, en 1948, les propriétés parasiticides d'un composé voisin, l'"hexachlorophène" (2,2', dihydroxy, 3,3', 5,5', 6,6', hexachlorodiphényl-méthane) sur Raillietina cesticillus, Cestode parasite du poulet.



"Hexachlorophène" = "G 11"

La valeur thérapeutique du "dichlorophène" et de l'"hexachlorophène", qui sont maintenant largement utilisés dans le traitement des téniasis d'un grand nombre d'animaux, met en relief l'importance de la structure de base de ces composés, le noyau diphényl-méthane, et montre l'intérêt qu'une telle molécule est susceptible d'offrir dans la recherche de substances anthelminthiques nouvelles.

PREMIERE PARTIE

INTERET DE QUELQUES SUBSTITUTIONS SUR LA MOLECULE DU DIPHENYL-METHANE

Nous avons essayé, dans cette partie bibliographique, de préciser la nature et l'intérêt de divers groupements chimiques susceptibles d'être substitués sur la molécule du diphényl-méthane. Nous avons envisagé successivement l'étude de modifications affectant la partie cyclique, puis le groupement CH_2.

I

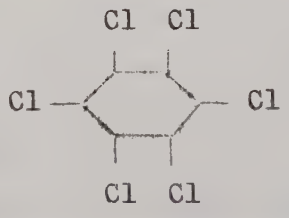
SUBSTITUTIONS PORTANT SUR LES NOYAUX AROMATIQUES

A - Influence du chlore

Un certain nombre de travaux effectués sur différents composés mono ou bicycliques chlorés nous renseignent sur l'importance de la fixation du chlore sur ce type de structure :

Parmi les composés monocycliques chlorés les plus intéressants, citons le paradichlorobenzène, étudié par DICKMANS (21). Il se montre actif à l'égard des Ankylostomes et des Trichocéphales du chien ; l'hexachlorocyclohexane ou H.C.H., connu pour ses propriétés insecticides, est également préconisé par divers auteurs (26, 44, 50).

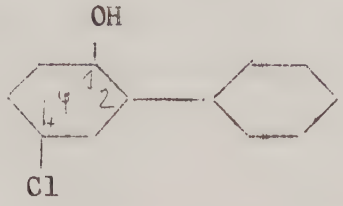
Paradichlorobenzène



Hexachlorocyclohexane (H.C.H.)

GRAEVE et HERRNRING (26) constatent qu'une émulsion de l'isomère γ de l' H.C.H. tue les nématodes du cheval, "in vitro", à une concentration d'environ 0,3 mg p. 100. SCHNEIDER (50), expérimentant l' H.C.H. comme oxyuricide, mentionne que la fraction γ est 5 à 10 fois plus toxique chez le rat que le mélange des différentes parties, mais que la dose curative est bien au-dessous de la dose létale. Pour cet auteur, l' H.C.H. semble agir sur le système nerveux central et les muscles lisses des parasites.

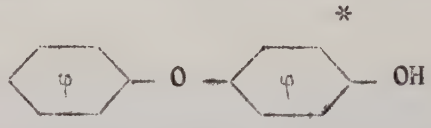
En ce qui concerne les composés chlorés à structure bicyclique, il faut mentionner les travaux récents de KROTOV et BEKHLI (36) qui mettent en évidence le pouvoir ascaricide élevé et la faible toxicité du 2 - cyclohexyl - 4 - clorophénol, chez le rat. Etudiant l'influence exercée par la présence



2 - cyclohexyl-4- chlorophénol

du chlore sur quelques diphényls, CHUZABURO (13) mentionne que l'introduction de chlore dans les phényl-phénols et les hydroxy-diphényl-éthers n'a pas d'action favorable sur l'activité ascaricide.

Phényl-phènol



Hydroxy-diphényl-éther

KERR et GREEN (35) obtiennent, par contre, des résultats différents ces auteurs ont étudié sur R. Cesticillus une série de sept hydroxy-diphényl-méthanes halogénés différant par le nombre et la position des groupements hydroxyles ainsi que par le nombre, la position et la nature des substituants halogénés : ils remarquent que le degré d'activité anthelminthique semble être en rapport avec le nombre d'atomes de chlore dans la molécule : en effet l'activité ténicide augmente lorsqu'on passe du composé dichloré au composé tétrachloré, et du tétrachloré à l'hexachloré. Les modifications portant sur la nature de l'halogène (remplacement du chlore par du brome) ne semblent pas avoir une influence marquée sur l'activité.

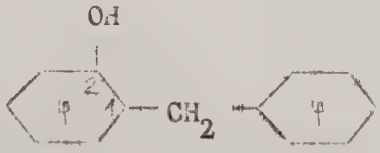
Ainsi, bien que le petit nombre de recherches effectuées ne nous permette pas de tirer des conclusions valables, l'ensemble des travaux sur les diphényl-méthanes halogénés et sur certains dérivés chlorés du cyclohexane et du benzène nous amène à constater que la présence d'un ou de plusieurs

* La positiondes OH - est variable.

atomes de chlore sur une structure cyclique engendre une activité anthelminthique souvent élevée.

B - Influence du groupement hydroxyle

LAMSON et ses collaborateurs (38), puis BALDWIN (3), ont essayé de déterminer l'influence exercée sur l'activité anthelminthique par la position du groupement hydroxyle, chez deux dérivés du diphényl-méthane, le 2 et le 4 - hydroxy-benzylphénol.

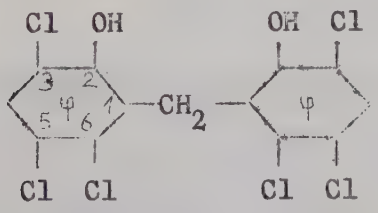


2 - hydroxy-benzylphènol

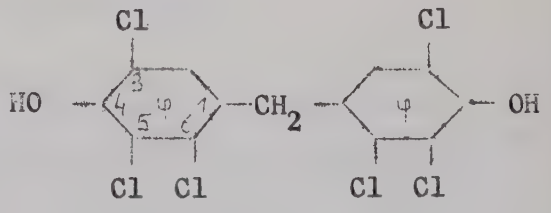
4 - hydroxy-benzylphénol

Les résultats obtenus par ces auteurs, dans des tests "in vitro" sur l'Ascaris du porc, sont assez divergents : LAMSON et ses collaborateurs trouvent une forte action ascaricide avec les composés à hydroxyle en position ortho tandis que ceux à hydroxyle en position para sont inactifs. BALDWIN trouve, contrairement à LAMSON, que les deux sont actifs, mais que le para-benzylphénol est trois fois plus actif que le composé ortho.

Il faut également remarquer, parmi les hydroxy-diphényl-méthanes halogénés testés par KERR et GREEN (35), que le 2,2', dihydroxy, 3,3', 5,5', 6,6', hexachlorodiphényl-méthane ("hexachlorophène") est très actif , alors que le 4,4', dihydroxy, 3,3', 5,5', 6,6', hexachlorodiphényl-méthane est pratiquement inactif.

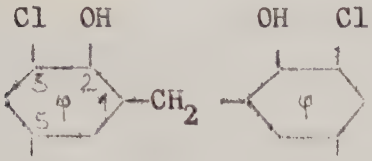


2,2', dihydroxy, 3,3', 5,5', 6,6', hexachlorodiphényl-méthane

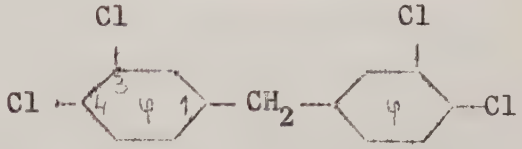


4,4', dihydroxy, 3,3', 5,5', 6,6', hexachlorodiphényl-méthane

Il semble donc, dans ce cas, que la fixation du groupement hydroxyle en ortho soit préférable à la position para. En outre, il convient de noter que le 2,2', dihydroxy, 3,3', 5,5', tétrachlorodiphényl-méthane ("dichlorophène") présente la même activité que le 3,3', 4,4', tétrachlorodiphényl-méthane qui ne possède pas d'hydroxyle ; mais, la position des atomes de chlore étant différente chez ces deux composés, aucune conclusion valable



2,2', dihydroxy, 3,3', 5,5', tétrachlorodiphényl-méthane



3,3', 4,4', tétrachlorodiphényl-méthane

ne peut en être tirée.

Ainsi, l'absence de résultats significatifs et le petit nombre de substances étudiées ne permettent pas, à notre connaissance, de déterminer s'il existe pour ce type de structure une position privilégiée du substituant hydroxyle sur le noyau phénolique, ou même si la présence de ce substituant est nécessaire à l'activité.

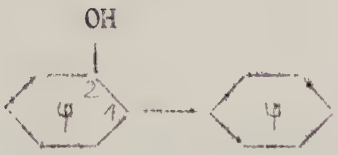
En ce qui concerne les conséquences d'un blocage de ce groupement par éthérification, BALDWIN (3) mentionne que, parmi les phényl-phénols et les benzyl-phénols, son remplacement par un radical éthoxy, en position 2 ou 4, abolit toujours l'activité.

II

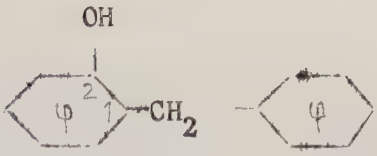
MODIFICATIONS PORTANT SUR LE GROUPEMENT CH_2.

A - Influence de la longueur du radical hydrocarboné

Les travaux de LAMSON et ses collaborateurs (38) permettent de comparer l'action "in vitro", sur l'Ascaris du porc, de l'ortho-phényl-phénol et de l'ortho-benzyl-phénol ; les résultats obtenus mettent en évidence une nette réduction du pouvoir ascaricide pour la forme diphényl.



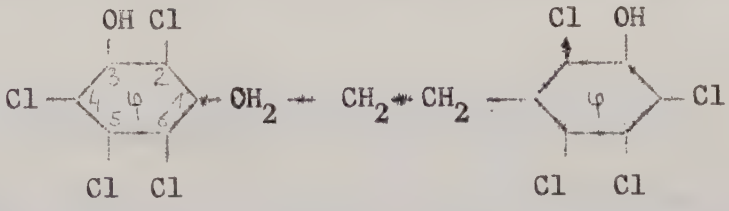
Ortho-phényl-phénol



Ortho-benzyl-phénol

La suppression du groupement CH_2 entre les noyaux benzéniques semble donc avoir une action défavorable sur l'activité anthelminthique.

KERR et GREEN (35) ont, d'autre part, testé un hydroxy-diphényl-propane chloré (le 3,3', dihydroxy, 2,2', 4,4', 5,5', 6,6', octachlorodiphényl-propane) à l'égard de Raillietina cesticillus, chez le poulet. Ce composé



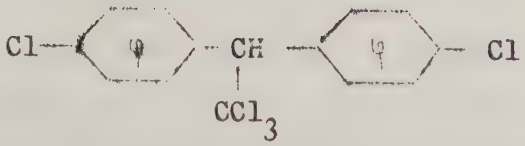
3,3', dihydroxy, 2,2', 4,4', 5,5', 6,6' octachlorodiphényl-méthane

est peu actif, mais aucun hydroxy-diphényl-méthane halogéné de structure analogue n'ayant été étudié, il n'est pas possible de déterminer le facteur responsable de cette perte d'activité.

Ainsi, le manque de résultats significatifs ne nous permet pas de conclure sur l'utilité d'un accroissement du nombre des atomes de carbone reliant les deux noyaux phénoliques. Il semble cependant que ce type de liaison par un reste hydrocarboné soit préférable à une jonction directe des structures cycliques entre elles.

B - Influence d'un substituant chloré

Comme substance correspondant à ce type de modification et étudiée en tant qu'anthelminthique, citons le 4,4', dichlorodiphényl-trichloroéthane, ou D.D.T., bien connu pour ses propriétés insecticides.



4,4', dichlorodiphényl-trichloroéthane

Les quelques résultats que nous avons relevés sont assez contradictoires : LEBEAU et JANOT (41) mentionnent que le D.D.T. très pur serait, en médecine vétérinaire, remarquablement efficace contre les vers intestinaux, ceux des conduits biliaires, et dans le traitement des coccidioses. Par contre, MAKSIC (42), ayant testé l'activité du D.D.T. chez le cheval, attribue à cette substance peu de valeur en tant qu'anthelminthique.

III

HYPOTHESES DE TRAVAIL;ETUDE DE NOUVELLES SUSBTITUTIONS

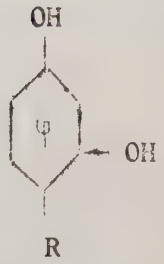
Nous avons consacré ce chapitre à l'étude de quelques groupements chimiques intéressants en thérapeutique anthelminthique et susceptibles d'être introduits dans la molécule du diphényl-méthane.

A - Intérêt des noyaux phénoliques

Parmi les phénols non substitués, le β NAPHTOL, mentionné par WATKINS (54), présente des propriétés anthelminthiques appliquées pour la première fois par BENTLEY, en 1904, et testées par SCHUFFNER et VERVOORT, en 1913, sur l'Ankylostome. Ce composé possède "in vitro" une forte toxicité à l'égard des Cestodes, des Ascaris et des Ankylostomes (45,3) mais, comme le mentionne GREENE (27), son goût et sa toxicité excluent toute utilisation.

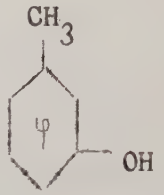
La fixation de groupements alkyls sur la molécule de divers phénols a permis d'obtenir un certain nombre de corps présentant, tant au point de vue de l'activité anthelminthique que de la toxicité, un intérêt beaucoup plus grand. Dans ce groupe des alkyl-phénols, deux types de structures ont fait l'objet d'études approfondies. Ce sont, d'une part, les alkyl-résorcinols, très étudiés par LAMSON et ses collaborateurs (38, 39). La substance

la plus active de cette série est l'hexyl-résorcinol dont le pouvoir létal est très marqué à l'égard des Ascaris et des Ankylostomes. Ce sont, d'autre part, les alkyl-méta-crésols dont la molécule correspond à la fixation sur un noyau aromatique de trois groupements, un méthyl, un hydroxyle, et un radical alkyl. Les composés appartenant à cette série diffèrent essentiellement par la nature et la position de la chaîne hydrocarbonée . Afin de préciser la configuration structurale correspondant à des conditions optima d'activité, nous avons retenu différents travaux effectués sur ces dernières substances.



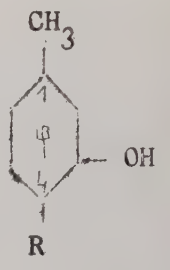
Alkyl-résorcinol

Le méta-crésol. - testé "in vitro" sur l'Ascaris du porc, il est totalement inactif. Par contre, toute une série de dérivés intéressants correspond à la fixation d'un groupement alkyl sur un tel noyau ; ce radical alkyl peut être, soit une chaîne droite, soit une chaîne substituée.



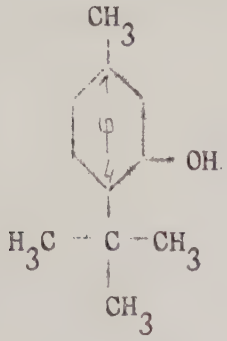
Méta-crésol

Alkyl-méta-crésols à chaîne droite. - LAMSON et ses collaborateurs (38, 39) ont étudié les propriétés ascaricides, chez le chien, d'un certain nombre de substances appartenant à la série des 4-alkyl-méta-crésols. ILs ont pu ainsi mettre en évidence une activité ascaricide maximum pour des chaînes renfermant de 3 à 7 atomes de carbone. WILLIAMS et ses collaborateurs (55) ont également testé, par la même technique que LAMSON, un certain nombre d'hexyl-méta-cresols, le chlore étant fixé directement sur le noyau. De tels dérivés chlorés présentent un pouvoir ascaricide plus faible que les composés non chlorés étudiés par LAMSON. La fixation d'un atome de chlore sur le noyau semble donc ne pas avoir de répercussion aussi bien sur la toxicité que sur l'activité de ces produits.

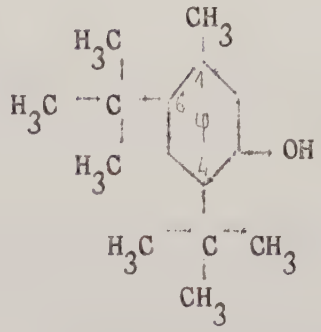


4-alkyl-méta-crésol

Alkyl-méta-crésols à chaîne substituée. - Citons tout d'abord, dans ce groupe, le 4 - tert-butyl et le 4,6, ditert-butyl-méta-crésol, étudiés par ENZIE (24), qui présentent peu d'intérêt.

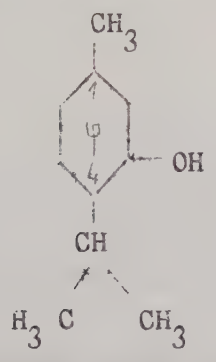


4-tert-butyl-méta-crésol

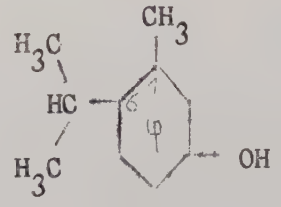


4,6, ditert-butyl-métacrésol

Par contre, la présence d'une chaîne substituée isopropyl semble liée à la manifestation de propriétés anthelminthiques beaucoup plus marquées : à cette structure correspondent, en effet, deux substances isomères actives, le 6-isopropyl-méta-crésol et surtout le 4-isopropyl méta-crésol ou **THYMOL**.



4-isopropyl-méta-crésol = THYMOL



6-isopropyl-méta-crésol = ISOTHYMOL

Le 6-isopropyl-méta-crésol, ou ISOTHYMOL, est préconisé par ENZIE (24) comme un composé très prometteur doué, chez le chien, de propriétés ascaricides très marquées et d'une faible toxicité ; mais son activité à l'égard des Ankylostomes est très faible.

Les propriétés anthelminthiques du THYMOL sont, par contre, connues de longue date et ce corps a été l'objet de très nombreux travaux expérimentaux et d'un usage prolongé et intensif en thérapeutique humaine. Dès 1879,

BOZZOLO utilise le thymol, chez l'homme, dans le traitement de l'ankylostomose. A la suite d'innombrables cas traités avec succès, ce produit a longtemps occupé, avec le tétrachlorure de carbone, une place de premier ordre dans le traitement de cette maladie.

Mais l'activité du thymol ne se limite pas à cette parasitose. Ainsi, LAMSON et ses collaborateurs (38) ayant testé sa toxicité à l'égard de l'Ascaris, constatent :

d'une part, dans des essais "in vitro" sur l'Ascaris du porc, que le thymol tue 100 p. 100 des vers au bout de 30 minutes ;

d'autre part, dans des essais "in vivo" chez le chien, qu'une dose de 0,1 g de thymol pulvérisé déparasite 100 p. 100 des animaux en expérience et qu'une dose de 0,05 g provoque une réduction de 72 p. 100 du nombre de ces helminthes.

KERR et CAVETT (34), étudiant également son action sur Ascaridia galli du poulet, éliminent avec ce composé 50 p. 100 des vers. Cependant, LAMSON (38) reconnait que, chez l'homme, le thymol n'est pas un ascaricide de grande valeur.

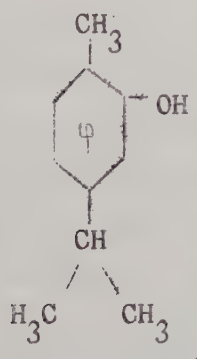
Le thymol est également un bon ténifuge. REBELLO et ses collaborateurs (45) mettent en évidence, in vitro, sa toxicité sur les Cestodes. BRUMPT (7) reconnait son efficacité sur les Cestodes des chiens, des chats et des moutons. Cet auteur mentionne, de plus, que de bons résultats ont été obtenus avec ce produit dans le traitement de l'oxyurose, de l'anguillulose et également de la distomatose intestinale, en Indochine.

Assez récemment, quelques substances résultant de la combinaison du thymol avec divers groupements chimiques ont été introduites dans la thérapeutique anthelminthique. Le thymolsulfonate de pipérazine, étudié par BAILENGER et JULES (2), associe deux substances présentant chacune indépendamment l'une de l'autre, d'importantes propriétés anthelminthiques ; ce composé possède une activité oxyuricide et ascaricide élevée, associée à une faible toxicité. Par contre, le thymolsulfonate de sodium est totalement inactif "in vitro" à l'égard de Rhabditis macrocerca et de l'Ascaris du porc, alors que le thymol tue ce dernier à la dilution de 1 p. 5.000. Il semble

donc que la fixation du groupement SO_3H en position ortho sur la molécule de thymol inactive cette dernière.

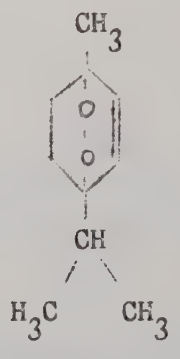
L'EGRESSINE, ester thymolique de l'acide N-isoamyl-carbamique, a également suscité un grand intérêt chez de nombreux auteurs. Les résultats obtenus avec ce produit par SAUER et WEISSFLUG (49), dans le traitement de l'oxyurose, se sont révélés très prometteurs ; par contre, GODDARD et BROWN (25), aux Etats-Unis, COUTELEN et ses collaborateurs (15), en France, n'obtiennent, avec ce même médicament et la même posologie, qu'un pourcentage de guérisons de l'ordre de 40 p. 100. De plus, à l'opposée des premiers auteurs qui insistent sur la bonne tolérance du produit, COUTELEN et ses collaborateurs mentionnent que plus du tiers des enfants traités présente des signes d'intolérance et qu'un produit possédant de tels inconvénients ne peut être considéré comme un oxyuricide de choix.

Deux substances qui dérivent du thymol par des modifications portant sur le groupement hydroxyle ont également été étudiées : ce sont, d'une part, le CARVACROL, ou para-isopropyl-ortho-crésol, dont l'activité est voisine de



carvacrol

Paracymène



Ascaridol

celle du thymol (38) et dont la toxicité est sensiblement égale ou même légèrement supérieure chez certains animaux, et, d'autre part, le PARACYMENE, constituant de l'huile de chénopodium, qui n'est autre que du thymol deshydroxylé. Ce dernier composé est un peu moins actif, mais beaucoup moins toxique que l'ASCARIDOL, principe actif de cette huile, dont il y a lieu de rapprocher la structure de celle du thymol. Il semblerait donc, d'après ces résultats, que la fixation du groupement hydroxyle en ortho ne provoque

pas de variation importante de l'activité du thymol, du moins à l'égard des Ascaris et des Oxyures.

Ainsi, un grand nombre de substances phénoliques appartenant à la série des alkyl-méta-crésols possède des propriétés anthelminthiques intéressantes : le degré maximum d'activité semble correspondre à la structure isopropyl-méta-crésol, et, plus précisement, au thymol. En effet, ce composé est actif à l'égard de parasites très variés et sa valeur est,de plus, confirmée par un grand nombre de travaux expérimentaux.

B - Intérêt des hydrocarbures chlorés aliphatiques

Les hydrocarbures chlorés aliphatiques sont utilisés depuis longtemps comme anthelminthiques.

Dès 1885, BENNET emploie le CHLOROFORME ($CHCL_3$) dans le traitement de l'ankylostomose des mineurs ; HALL (28), en 1917, trouve ce même produit très actif sur l'Ankylostome du chien. HALL (28) et GREENE (27) lui reconnaissent également une certaine activité dans le traitement de l'ascaridiose.

C'est ensuite le TETRACHLORURE DE CARBONE (CCl_4) qui est préconisé, en 1921, par HALL (29) dans le traitement de l'ankylostomose et, selon LAUNOY (40), en 1928, par MONTGOMERY pour son action sur la Douve des bovins et des ovins. REBELLO et ses collaborateurs (45) indiquent une action non négligeable de cette même substance "in vitro" sur les Cestodes et les Ascaris, tandis que E. BRUMPT (7) mentionne également son activité dans le traitement de l'oxyurose.

En 1925, HALL et SHILLINGER (30) préconisent le TETRACHLORETHYLENE ($C_2 Cl_4$), moins toxique et plus maniable que le tétrachlorure de carbone, dans le traitement de l'ankylostomose. KUDICKE et WEISE (37) reconnaissent l'action létale du tétrachloréthylène et du TETRACHLORETHANE ($CHCl_2—CHCl_2$) sur les larves de Strongles (Strongyloïdes stercoralis). ROGERS (46) met également en évidence la toxicité du tétrachloréthylène à l'égard de Nippostrongylus muris, chez le rat.

En plus du tétrachloréthane, trois autres dérivés chlorés de l'éthane manifestent également des propriétés intéressantes : le méthyl-

chloroforme, ou trichloréthane, ($CH_3 - CCl_3$) est actif sur les Ascaris et les Ankylostomes du chien (23) ; le pentachloréthane ($CHCl_2-CCl_3$) possède également une activité marquée à l'égard d'Ankylostoma caninum, mais il est assez toxique (56) ; enfin, l'hexachloréthane ($C_2 Cl_6$) est largement utilisé dans le traitement de la fasciolose du bétail (54) et manifeste une toxicité élevée sur l'Ankylostome du mouton (17).

WRIGHT et SCHAFFER (56) ont entrepris, en 1932, l'étude systématique d'un grand nombre d'hydrocarbures chlorés, homologues supérieurs du méthane, différant entre eux, soit par la longueur de la chaîne hydrocarbonée, soit par le nombre et la position des atomes de chlore. Ce travail leur a permis de tirer les conclusions générales suivantes : pour des séries homologues, d'une part, la toxicité est d'autant plus forte que le nombre des atomes de chlore fixés sur plusieurs atomes de carbone est grand, et, d'autre part, l'augmentation du nombre des atomes de chlore fixés sur un seul atome de carbone (le dernier de préférence) semble accroître l'activité à l'égard d'Ancylostoma caninum ; pour un même nombre et une même position des atomes de chlore, l'allongement de la chaîne hydrocarbonée semble aller de pair avec une élévation de la toxicité pour Ancylostoma caninum ; tous les composés possédant un pouvoir anthelminthique élevé ont une solubilité aqueuse très faible comprise entre 1/1250 et 1/4000.

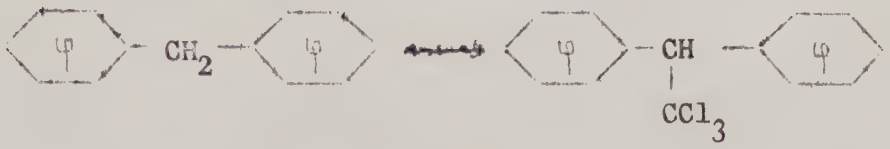
De l'étude des hydrocarbures halogénés, nous pouvons dégager les faits suivants. Deux groupes de substances sont particulièrement actifs : les dérivés chlorés du méthane, avec le chloroforme et le tétrachlorure de carbone, et les dérivés chlorés de l'éthane qui, du composé trichloré au composé hexachloré, possèdent tous des propriétés anthelminthiques. D'autre part, les travaux de WRIGHT et SCHAFFER semblent indiquer qu'au point de vue structural une concentration des atomes de chlore sur le carbone terminal correspond à la répartition en halogène la plus apte à déterminer un pouvoir anthelminthique élevé.

C - Objet de la partie expérimentale

Les constatations résultant des recherches précédentes nous ont amenés à étudier expérimentalement quatre dérivés de substitution du

diphényl-méthane. Les modifications apportées sont les suivantes :

1 - Le radical-CH_2- du diphényl-méthane est remplacé par un groupement trichloroéthane dont les trois atomes de chlore sont fixés sur le même atome de carbone. Si l'on se réfère aux résultats obtenus par WRIGHT et SCHAFFER, précédemment rapportés, une telle configuration structurale semble optimum.



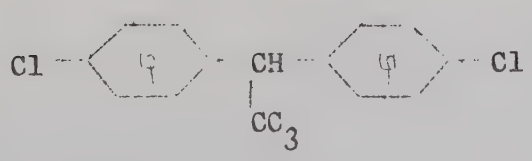
2 - Divers substituants sont fixés sur la partie cyclique de la molécule.

Trois des substances étudiées sont caractérisées par la fixation en position para, respectivement, d'atomes de chlore, de groupements hydroxyles libres et de groupements hydroxyles bloqués par éthérification. L'intérêt du chlore, des hydrocarbures chlorés aliphatiques et des substances phénoliques, que nous avons précèdemment mis en évidence, nous a semblé justifier ces substitutions.

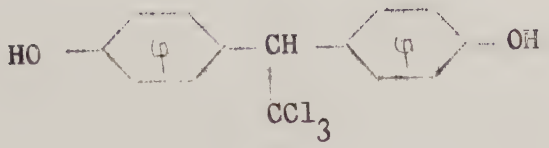
Nous avons également souligné, dans notre revue bibliographique, la valeur anthelminthique du thymol. Cela nous a amenés à introduire, chez un quatrième composé, les trois substituants méthyle, hydroxyle et isopropyle caractéristiques de cette molécule.

Les quatre corps dont nous avons réalisé l'étude expérimentale répondent ainsi aux formules suivantes :

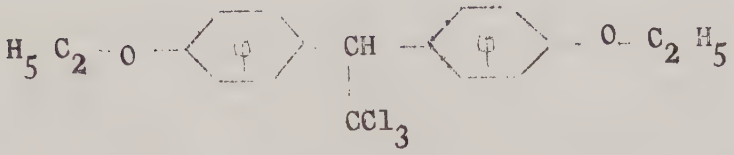
4,4', dichlorodiphényl-trichloroéthane



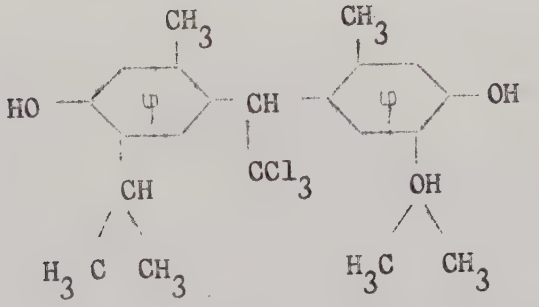
4,4', dihydroxydiphényl-trichloroéthane



4,4', diéthoxydiphényl-trichloroéthane

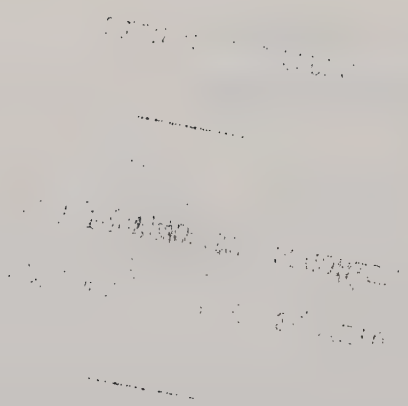


dithymyl-trichloroéthane



DEUXIEME PARTIE

METHODES ET TECHNIQUES D'ETUDE PHARMACOLOGIQUE



I

CONDITIONS D'UTILISATION DES PRODUITS ETUDIES

Les quatre composés étudiés sont utilisés, en raison de leur insolubilité dans l'eau, à l'état de suspensions dans un excipient visqueux. Le sirop de sucre, dilué dans des proportions convenables, a été choisi (le taux de dilution est le suivant : 100 ml de sirop de sucre pour 110 ml d'eau distillée). Avant leur mise en suspension, les produits subissent une pulvérisation très poussée afin d'obtenir un milieu aussi homogène et aussi stable que possible.

L'administration à l'animal est effectuée par introduction directe de la suspension dans l'estomac à l'aide d'une seringue munie d'une aiguille dont l'extrémité porte un renflement en forme d'olive.

Remarque : la viscosité de la suspension ne permettant pas de dépasser des concentrations en produit de 10 p. 100 et, d'autre part, la quantité administrable à une souris de 20 g , en une seule fois, n'excédant pas 0,8 ml, il a été nécessaire pour les fortes doses de donner le produit en deux prises successives à une heure d'intervalle.

II

DETERMINATION DE LA TOXICITE

A - Toxicité aigüe.

Nous avons utilisé la méthode de BEHRENS et KAERBER (4,5) qui permet de calculer avec assez de précision la dose mortelle médiane ou D.L. 50, dose tuant 50 p. 100 des animaux en expérience.

Cette méthode consiste à administrer aux animaux répartis en lots homogènes des doses croissantes de produit allant de la dose maxima

tolérée à la dose tuant la totalité du lot en expérience. On note le nombre de décès pour chaque dose.

Pour calculer la D.L. 50, BEHRENS et KAERBER préconisent la formule suivante :

$$Dm = Df - \frac{\Sigma(a \times b)}{m}$$

Dm = Dose mortelle mediane (D.L. 50),
Df = Dose toujours mortelle,
a = Moyenne des morts à deux doses successives,
b = Différence entre deux doses successives,
m = Nombre d'animaux utilisés pour chaque dose,
Σ = Somme.

B - Toxicité chronique

La détermination de la toxicité chronique permet de déceler une éventuelle manifestation toxique du produit étudié lorsqu'il est ingéré pendant un temps prolongé et à une dose apparemment dépourvue de toxicité.

Le traitement consiste à administrer quotidiennement, à un lot homogène d'animaux, une quantité de produit correspondant sensiblement à la dose supposée devoir être la plus forte utilisée en thérapeutique humaine et cela pendant 1 mois. Un deuxième lot identique servant de témoin reçoit, dans les mêmes conditions, uniquement l'excipient utilisé pour l'administration du produit.

Au cours du traitement, on suit les courbes de poids des deux lots d'animaux. Au début et à la fin de l'expérience, on effectue pour chaque animal une numération globulaire et une formule hémoleucocytaire. A la fin du traitement, les viscères sont prélevés (foie, rein, estomac, intestin grêle, côlon) et soumis à un examen anatomo-pathologique.

III

DETERMINATION DE L'ACTIVITE ANTHELMINTHIQUE

Pour apprécier la valeur anthelminthique d'une substance, deux catégories de tests peuvent être utilisées :

essais "in vitro" sur des vers isolés, en survie ou en culture ;
essais "in vivo" sur le parasite à l'intérieur même de son hôte.

Nous avons volontairement limité cette étude à une expérimentation "in vivo" sur l'animal parasité. En effet, en raison de leur insolubilité dans l'eau, les substances ne peuvent être employées qu'en suspension ; les possibilités de contact entre le parasite et le médicament, dans un essai "in vitro" sont donc extrêmement limitées.

A - Méthode de DESCHIENS et ses modifications

Parmi les tests "in vivo" utilisant des helminthoses animales, nous avons choisi la souris blanche infestée spontanément par deux oxyuridés, Syphacia obvelata (RUDOLPHI, 1802) et Aspiculuris tetraptera (NITZSCH, 1821), ainsi que par un Cestode, Hymenolepis nana (VON SIEBOLD, 1852).

DESCHIENS (18, 19) semble avoir été le premier à mettre à profit le parasitisme des souris. Il administre en général le produit par voie rectale et considère le résultat de l'expérience comme positif ou négatif suivant qu'il y a absence ou présence de parasites vivants dans l'intestin de l'animal autopsié, à la fin du traitement.

Divers auteurs ont apporté à cette méthode un certain nombre de modifications :

1 - Infestation expérimentale des souris, mais cette technique est longue et si l'on compare les chiffres obtenus par BROWN et ses collaborateurs (6) et CHAN (12) qui ont utilisé respectivement, pour tester la même substance, l'infestation expérimentale et spontanée de la souris par les oxyuridés cités précédemment, on constate que les résultats sont sensiblement identiques.

2 - Administration de la substance étudiée par tubage gastrique. Ce mode de traitement semble préférable à l'injection rectale : en effet, d'une part, au cours de l'injection rectale, il arrive que la souris rejette une partie du produit administré et, d'autre part, le tubage gastrique se rapproche beaucoup plus de la voie orale utilisée en thérapeutique humaine.

3 - Numération des vers et dissociation entre les deux espèces d'oxyuridés. Les résultats obtenus par BROWN et ses collaborateurs (6) semblent en effet, montrer que la sensibilité de chacune de ces deux espèces n'est pas la même.

4 - Notion de réduction du nombre de vers sous l'action du produit lorsque les animaux ne sont pas totalement déparasités.

B - Technique utilisée

La technique que nous avons utilisée tient compte de cet ensemble de modifications ; elle comporte un certain nombre d'étapes successives.

1 - Choix des Souris : Toutes les souris sur lesquelles nous étudions l'action du produit sont choisies entre 19 et 21 grammes, dans un même élevage, afin que leur parasitisme soit le plus homogène possible.

2 - Recherche des parasites : Sur le lot choisi, on détermine la nature des parasites par identification de leurs oeufs dans les déjections de chaque animal. Nous avons utilisé, pour cette recherche, la méthode de concentration par flottaison de JANECKSO et URBANYI qui donne d'excellents résultats avec les oeufs d'Oxyures et d'Hymenolepis (1) ; la technique en est la suivante : quelques pellets émis par l'animal sont recueillis dans un tube à hémolyse puis écrasés et triturés avec 2 à 3 ml du réactif à l'iodomercurate de JANECKSO. La suspension ainsi obtenue est centrifugée (2 à 3 minutes à 2.500 tours/minute) puis, à l'aide d'une anse métallique préalablement flambée, on recueille une partie du film superficiel du liquide, qui est déposée sur une lame et examinée au microscope.

Quelques remarques sont à faire en ce qui concerne la fréquence du parasitisme par Aspiculuris tetraptera, Syphacia obvelata et Hymenolepis nana, chez la souris :

Le pourcentage de souris parasitées par A. tetraptera et S. obvelata est très variable d'un élevage à l'autre. Dans certains lots, l'infestation par ces deux espèces peut atteindre et même dépasser 70 p. 100 des animaux, tandis que, chez d'autres lots, sur 30 à 40 souris examinées, aucun oeuf n'a pu être décelé. En ce qui concerne le parasitisme par H. nana, bien qu'également très variable, il semble présenter une fréquence nettement inférieure à celle des oxyuridés précédents.

3 - Traitement : Après avoir été isolées, les souris parasitées sont réparties en deux lots à peu près égaux. L'un reçoit une quantité déterminée d'une suspension à un titre connu du produit étudié, à raison d'un traitement par jour et pendant un certain nombre de jours. Le deuxième lot sert de témoin : il reçoit une quantité identique de sirop de sucre dilué ayant servi à la préparation de la suspension.

4 - Contrôle du traitement :

a) Coprologie : A la fin du traitement, les oeufs sont à nouveau recherchés dans les fèces des souris en expérience. Cependant, un examen négatif ne permet nullement de conclure à une déparasitation de l'animal, l'émission des oeufs par le parasite pouvant être influencée par un très grand nombre de facteurs.

b) Autopsie : Toutes les souris mises en expérience sont sacrifiées et autopsiées 2 à 3 jours après la fin du traitement, afin de rechercher les parasites dans leur intestin. Nous prélevons, chez chaque animal, la partie terminale de l'intestin grêle (jéjuno-iléon), le caecum et le gros intestin en entier. Les oxyuridés se situent dans le caecum et le gros intestin, mais comme le font remarquer THOMPSON et REINERTSON (52), les deux espèces ont tendance à occuper une localisation différente au niveau de ces deux parties de l'intestin : Syphacia obvelata se rencontre surtout au niveau du caecum tandis qu'Aspiculuris tetraptera est présent au niveau du gros intestin. Hymenolepis nana est, par contre, localisé dans l'iléon.

Chaque partie de l'intestin prélevée est ensuite placée dans un verre de montre rempli de soluté physiologique, puis incisée longitudinalement. Les muqueuses du caecum et du gros intestin sont raclées avec soin

pour en détacher les oxyuridés qui pourraient y adhérer, puis lavées avec du soluté physiologique. Pour l'intestin grêle, des précautions particulières sont à prendre : il est nécessaire d'inciser le plus superficiellement possible le morceau d'intestin afin d'éviter de sectionner les strobiles des Hymenolepis ; une fragmentation de ces chaînes rendrait en effet beaucoup plus délicate l'évaluation ultérieure du nombre de vers.

5 - Numération des parasites :

Aspiculuris tetraptera et Syphacia obvelata : On compte les oxyuridés dans chaque verre de montre à la loupe binoculaire. Si leur nombre est trop important ou si le contenu intestinal rend le milieu trop trouble, il est nécessaire de fractionner le liquide initial. La différenciation des deux espèces doit être effectuée en même temps que la numération par examen des vers à la loupe, à un grossissement plus poussé.

Hymenolepis nana : On détermine le nombre de scolex, après avoir détaché ceux qui adhérent encore à la muqueuse intestinale ; en effet, les Hymenolepis pouvant être sectionnés, la numération des longues chaînes de segments ne constitue pas une référence valable. Il est nécessaire également d'apprécier et de noter la longueur approximative de chaque ver.

6 - Expression des résultats : Cette expérimentation nous permet de calculer deux coefficients :

Pourcentage de déparasitation : Il doit tenir compte de la déparasitation spontanée de certaines souris, dont le lot témoin permet d'évaluer l'importance. Dans ces conditions, nous le calculons par la formule suivante : % déparasitation = % souris traitées déparasitées - % souris témoins spontanément déparasitées.

Pourcentage de réduction du nombre de vers : Ce taux de réduction du nombre de vers dans le lot traité, par rapport au lot témoin, nous est donné par la formule suivante :

$$\% \text{ réduction} = \frac{(A-A') \times 100}{A}$$

A = nombre moyen de vers dans le lot témoin.

A'= nombre moyen de vers dans le lot traité.

TROISIEME PARTIE

ETUDE EXPERIMENTALE

DU

4,4', DICHLORODIPHENYL - TRICHLOROETHANE

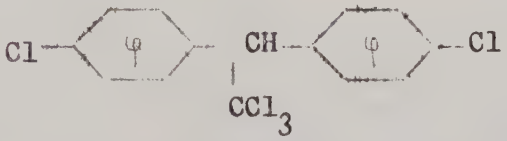
(D.D.T.)

I

CARACTERES GENERAUX

Le 4,4', dichlorodiphényl-trichloroéthane a été préparé pour la première fois en 1874 par ZEIDLER ; ce composé est mieux connu sous le nom de D.D.T. pour ses propriétés insecticides découvertes 62 ans plus tard par MULLER.

Sa formule est la suivante : $C_{14}\ H_9\ CL_5$.



Il se présente sous la forme d'une poudre blanche, microcristalline insoluble dans l'eau, peu soluble dans l'alcool à 95° (2 p. 100), soluble dans l'huile d'arachide (12,5 p. 100).

II

TOXICITE AIGUE

Par suite de l'importance du D.D.T. en tant qu'insecticide, de nombreux auteurs ont étudié sa toxicité chez l'animal. Sa dose létale 50, lorsqu'il est administré en solution dans l'huile d'olive et par voie orale, est, chez le rat ou la souris, voisine de 200 mg par Kg de poids d'animal (14,51,53). Mais aucun de ces travaux ne nous renseigne sur l'action létale du produit en l'absence d'élément lipidique.

Dans nos expériences, nous avons utilisé une suspension de D.D.T. à 4 p. 100 et les volumes administrés varient de 0,19 à 0,37 ml. Les résultat- obtenus sont les suivants :

Dose (en grammes par kg)	Nombre de souris en expérience	Nombre de souris tuées
0,375 g	10	0
0,500 g	10	5
0,625 g	10	7
0,750 g	10	10

Dose létale 50 (Dose mortelle médiane) du D.D.T. :

(calculée selon la méthode de BEHRENS et KAERBER)

Doses en g par Kg d'animal.....	0,375	0,500	0,625	0,750
Différence entre deux doses successives = b :		0,125	0,125	0,125
Nombre d'animaux traités = m.....	10	10	10	10
Nombre de morts.....	0	5	7	10
Moyenne de la somme des morts à deux doses successives = a.....		2,5	6	8,5
a x b.....		0,312	0,750	1,062

Dose toujours mortelle = Df = 0,750 g par Kilogramme.

$$\text{Doses mortelle médiane} = Dm = Df - \frac{\Sigma(a \times b)}{m} = 0,75 - \frac{2,125}{10} = 0,537$$

Dm = 0,537 g par kilogramme

III

ACTIVITE ANTHELMINTHIQUE

La dose journalière administrée au cours de cette expérience correspond au 1/5ème de la dose médiane mortelle calculée précédemment. Nous avons réuni dans le tableau ci-après (tableau I) les résultats obtenus au cours de cette étude.

Le D.D.T. administré à la dose de 100 mg par kg et par jour, pendant 6 jours, est pratiquement inactif à l'égard de Syphacia obvelata et d'Aspiculuris tetraptera. Il est totalement inactif sur Hymenolepis nana. La dose utilisée étant très proche de la dose minima mortelle, cela ne nous a pas permis de poursuivre notre expérimentation avec des quantités supérieures de produit.

De cet ensemble de résultats, nous pouvons conclure que le D.D.T. ne possède aucune valeur anthelminthique à l'égard des oxyuridés de la souris compte tenu de la toxicité du produit.

TABLEAU I

ACTIVITE ANTHELMINTHIQUE DU 4,4',DICHLORODIPHENYL-TRICHLOROETHANE(D.D.T.)

Lots	Nombre de souris	Nbre de traitements (1 tr./jour)	Dose par kg et par jour	Dose totale administrée (mg/Kg)	Nbre moyen de vers par souris	Pourcentage de déparasitation	Pourcentage de réduction	Mortalité
SYPHACIA OBVELATA								
Tem.	8	6	100 mg	600 mg	56	25%	0%	0%
Trait.	8				58			
ASPICULURIS TETRAPTERA								
Tem.	8	6	100 mg	600 mg	52	0%	46%	0%
Trait.	8				28			
HYMENOLEPIS NANA								
Tem.	5	6	100 mg	600 mg	4	0%	0%	0%
Trait.	5				4			

QUATRIEME PARTIE

ETUDE EXPERIMENTALE

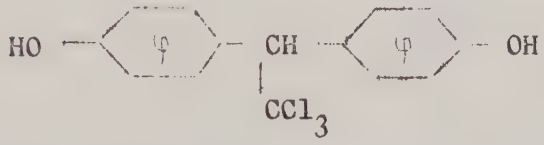
DU

4,4', DIHYDROXYDIPHENYL - TRICHLOROETHANE

I

CARACTERES GENERAUX

Ce composé répond à la formule suivante : $C_{14} H_{11} O_2 Cl_3$



Poids Moléculaire : 317,60

Point de fusion : 202° C (Banc de Kofler)

Il se présente sous l'aspect d'une poudre blanche, microcristalline insoluble dans l'eau, soluble dans l'alcool à 95° (>10 p. 100), très peu soluble dans l'huile d'arachide (<1 p. 100).

II

SYNTHESE

La synthèse de ce corps a été effectuée selon une technique dérivée de celle décrite par MEER (43)

Réactifs :

Chloral anhydre pur ;
Phénol cristallisé pur ;
Acide sulfurique concentré pur ;
Acide acétique cristallisable pur.

Technique : On met en présence 117,6 grammes de chloral anhydre avec 150 grammes de phénol. Le mélange liquide est introduit dans un flacon de KELLER à deux tubulures que l'on plonge dans un bain refrigérant (glace + chlorure de calcium). On ajoute goutte à goutte et très lentement, tout au moins au début de la réaction, 3 à 5 fois son volume d'un mélange composé d'1 partie (en volume) d'acide acétique cristallisable et 3 parties (en volume) d'acide sulfurique concentré. Agiter constamment à l'aide d'un agitateur mécanique. Veiller à ce que la température ne dépasse pas 15° C. Le mélange devient pâteux et cette phase dure plusieurs heures. Introduire cette masse, tout en agitant, dans un grand volume d'eau distillée maintenue au réfrigérateur (4 litres environ). Après repos de 24 heures, filtrer sur verre frité sous aspiration.

Purification : le produit pulvérulent est lavé à l'eau distillée jusqu'à pH neutre, puis séché et lavé au benzène. Il est ensuite dissous dans de l'acide acétique cristallisable. Ajouter alors 2 volumes de benzène : on obtient un précipité cristallin que l'on fait dissoudre dans l'alcool à 60°, à chaud, puis recristalliser par refroidissement ; le produit est redissout dans l'alcool à 60° à chaud et précipité par 2 volumes de benzène. Effectuer ensuite des cristallisations répétées dans l'alcool à 60°.

III
TOXICITE

Nous avons étudié successivement la toxicité aigüe et la toxicité chronique du dihydroxy-diphényl-trichloroéthane chez la souris.

A - Toxicité aigüe

Dans ces expériences, nous avons utilisé le dihydroxy-diphényl-trichloroéthane en suspension à 10 p. 100 et les quantités administrées varie. de 0,3 à 1 ml. Pour les doses les plus fortes, les volumes sont fractionnés en deux prises données à 1 heure d'intervalle. Les résultats obtenus sont les suivants :

Dose (en grammes par kg)	Nombre de souris en expérience	Nombre de souris tuées
1,5 g	10	0
2,0 g	10	3
2,5 g	10	4
3,0 g	10	5
3,5 g	10	5
4,0 g	10	7
4,5 g	10	7
5,0 g	10	10

Dose létale 50 du dihydroxy-diphényl-trichloroéthane :

(calculée en appliquant la formule de BEHRENS et KAERBER)

Doses en g par kg d'animal.....	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
Différence entre deux doses successives : b		0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Nombre d'animaux traités = m....	10	10	10	10	10	10	10	10
Nombre de morts.....	0	3	4	5	5	7	7	10
Moyenne de la somme des morts à deux doses successives = a....		1,5	3,5	4,5	5	6	7	8,5
a x b.....		0,75	1,75	2,25	2,5	3	3,5	4,25

Dose toujours mortelle = Df = 5 g par kilogramme.

$$\text{Dose létale 50} = Dm = Df - \frac{\Sigma (a \times b)}{m} = 5 - \frac{18}{10} = 3{,}20$$

Dm = 3,20 g par kilogramme

B - Toxicité chronique

Nous avons effectué cette étude chez la souris.

1° - Modalités de l'expérimentation : Un lot homogène de 10 souris reçoit, pendant une durée de 1 mois, une quantité de produit correspondant à une dose de 0,50 grammes par kg et par jour (soit, pour une souris de 20 g, 0,25 ml d'une suspension de dihydroxydiphényl-trichloroéthane à 4 p. 100). Nous avons administré parallèlement à un lot de 10 souris témoins la même quantité

de sirop de sucre dilué (soit 0,25 ml par jour) ayant servi à la mise en suspension du produit. Les animaux traités et les témoins sont soumis aux contrôles suivants :

Etude des variations pondérales : chaque lot est pesé avant le début du traitement puis, régulièrement, toutes les semaines jusqu'à ce que les animaux soient sacrifiés.

Numération des globules rouges, des globules blancs, et formule hémoleucocytaire, au début et à la fin du traitement.

Examen anatomo-pathologique pour chaque souris des organes suivants foie, rein, estomac, intestin grêle, côlon.

2° - Résultats

Lot n° 1 : 10 souris témoins reçoivent 0,25 ml de sirop de sucre dil par jour.

Lot n° 2 : 10 souris traitées reçoivent 0,50 grammes par kg et par jour de dihydroxydiphényl-trichloroéthane (soit le 1/6ème de la dose létale 50).

a) Mortalité

Lot n° 1 (animaux témoins) : aucune mortalité.

Lot n° 2 (animaux traités) : 2 morts

1 souris morte 9 jours après le début du traitement.
1 souris morte 19 jours après le début du traitement.

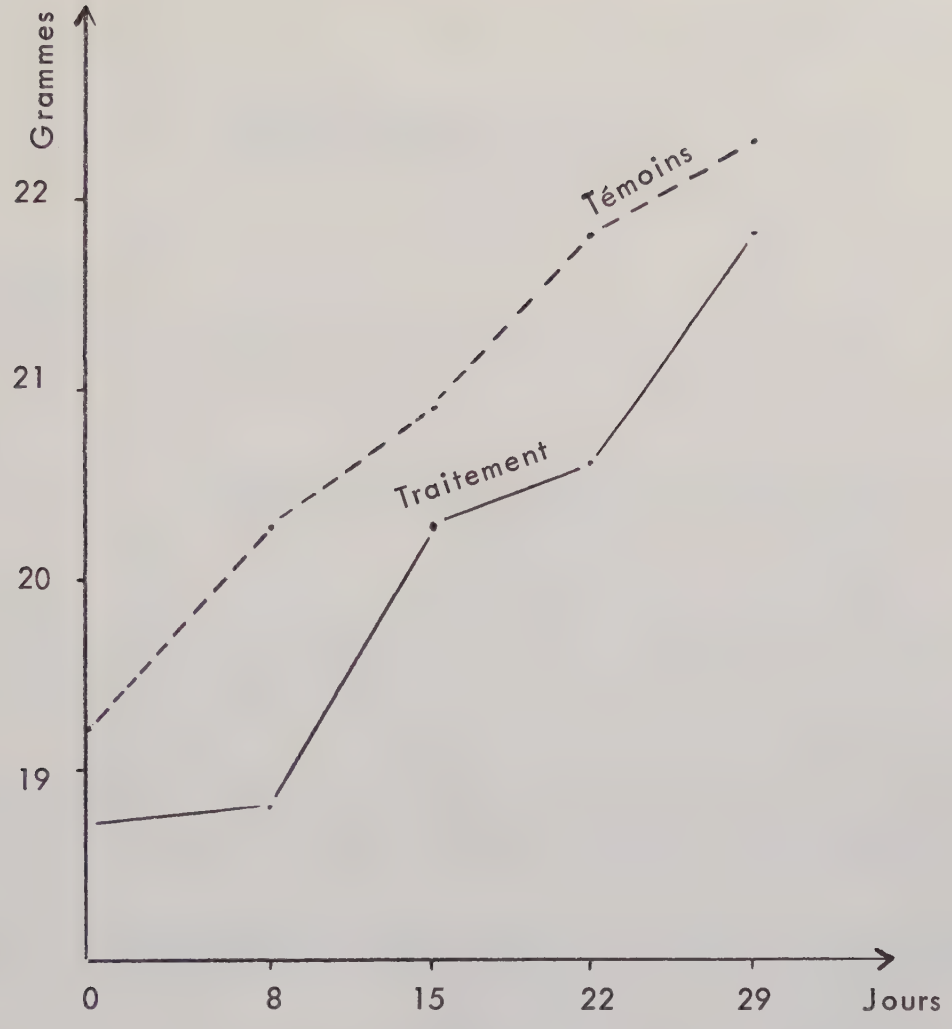
b) Etude des courbes de poids

Dates	Poids moyen par Souris Témoins	Traitées
22.9.64	19,2	18,7
30.9.64	20,3	18,8
7.10.64	20,9	20,3
14.10.64	21,8	20,6
21.10.64	22,3	21,8
Augmentation de poids =	16,1 %	16,5 %

A ces résultats correspondent les courbes ci-après (courbe 1). Celles-ci montrent que la croissance des animaux témoins est semblable à celle des 8 animaux traités.

c) Numération des globules rouges et des globules blancs

		Lot n° 1 Souris témoins	Lot n° 2 Souris traité
Nombre moyen de G.R. par mm3 de sang et par souris	avant le traitement.....	8.129.000	8.316.000
	après le traitement.....	8.275.000	8.022.000
Nombre moyen de G.B. par mm3 de sang et par souris	avant le traitement.....	10.496	11.619
	après le traitement.....	12.287	9.834



Courbe 1

Courbes de variations pondérales des Souris traitées par le dihydroxydiphényl-trichloro-éthane (0,50 g par Kg et par jour).

d) Formule hémoleucocytaire

		Lot n° 1 Souris témoins	Lot n° 2 Souris traité
Avant le traitement	Polynucléaires neutrophiles.....	39 p. 100	41 p. 100
	" éosinophiles.....	3 p. 100	5 p. 100
	" basophiles.....	0 p. 100	0 p. 100
	Lymphocytes.....	55 p. 100	52 p. 100
	Monocytes.....	3 p. 100	2 p. 100
Après le traitement	Polynucléaires neutrophiles.....	31 p. 100	35 p. 100
	" éosinophiles.....	5 p. 100	4 p. 100
	" basophiles.....	0 p. 100	0 p. 100
	Lymphocytes.....	59 p. 100	58 p. 100
	Monocytes.....	5 p. 100	3 p. 100

Comparons ces résultats à ceux indiqués par DUMAS (22) qui nous donne les valeurs des numérations rouge et blanche et des formules hémoleucocytaires obtenues par divers auteurs, chez des souris normales :

Numération des globules rouges	7.801.000 à 9.720.000	(KLEINEBERGER et CARL)
	8.250.000	(MEYER)
	7.800.000	(PETRI)
	6.030.000 à 8.370.000	(DUMAS)
Numération des globules blancs	7.500 à 13.260	(KLEINEBERGER et CARL)
	7.800	(MEYER)
	6.572	(PETRI)
	8.010	(DUMAS)

Pourcentage des globules blancs	Lymphocytes	petits : 30 à 50 % grands : 12 à 20 %
	Polynucléaires	neutrophiles : 25 à 55 %
	"	éosinophiles : 0,5 à 3 %
	Monocytes : 1 à 7 %	

Nous constatons que les écarts entre les chiffres extrêmes sont très grands. Si nous calculons approximativement les moyennes, nous obtenons les valeurs suivantes :

Globules blancs	Globules rouges	Lymphocytes	Polynucléaires Neutro.	éosino.	Monocytes
8.190	8.760.000	56 p. 100	40p. 100	2p.100	4 p. 100

La comparaison de ces moyennes à celles que nous avons obtenues montrent des écarts qui peuvent être considérés comme négligeables, vues les variations considérables des résultats d'un auteur à l'autre.

Ainsi, à la suite de ce traitement, aucune altération de la numération globulaire ni de la formule hémoleucocytaire n'a pu être observée.

e) Examen anatomo-pathologique

Trois jours après la fin du traitement, 5 souris témoins et les 8 souris restantes ayant reçu le produit sont sacrifiées et autopsiées. Nous prélevons sur chaque animal les organes suivants, foie, rein, estomac, intestin grêle et côlon, qui sont ensuite soumis à un examen anatomo-pathologique.

Les organes des animaux décédés au cours du traitement ont également été prélevés, aussitôt après la mort, et ont subi les mêmes examens.

Les conclusions de cette étude sont les suivantes :

Lot n° 1 - Animaux témoins

Aspect macroscopique : absence d'anomalies.

Foies : les 5 souris présentent des lésions discrètes d'hépatose (fait à peu près constant chez les rongeurs).
Une souris présente des lésions d'hépatite interstitielle d'origine infectieuse.

Reins : Phénomènes habituels de cadavérisation rénale.

Les muqueuses de l'estomac, de l'intestin grêle et du côlon sont normales.

Lot n° 2 - Animaux traités

Aspect macroscopique : absence d'anomalies.

Les examens des reins, de l'estomac, de l'intestin grêle et du côlon des 10 animaux ont donné lieu à des constatations absolument comparables à celles faites chez les témoins.

Par contre, les foies de 9 animaux, y compris ceux des 2 souris mortes au cours du traitement, présentent une discrète hépatose d'origine toxique possible.

De cet ensemble d'examens, il est donc possible de conclure que le dihydroxydiphényl-trichloroéthane, administré quotidiennement à la dose de 0,50 g par Kg (soit le 1/6 ème de la D.L. 50), pendant 30 jours, tue 20 p. 100 des animaux en expérience et semble provoquer des lésions hépatiques discrètes.

IV

ACTIVITE ANTHELMINTHIQUE

Nous avons procédé, pour l'étude de l'activité anthelminthique, à des essais "in vivo" chez l'animal parasité, suivant la technique décrite précédemment.

Les résultats obtenus à l'égard de Syphacia obvelata et Aspiculuris tetraptera sont résumés dans les tableaux II et III ; ils nous permettent de faire les remarques suivantes :

Syphacia obvelata : Nous n'avons pas pu déparasiter totalement les souris en expérience. Cependant, avec des doses totales comprises entre 3 g et 4,50 g / kg, nous déparasitons environ la moitié des animaux traités et, de plus, le nombre de vers est notablement réduit : le pourcentage de réduction est supérieur à 82 p. 100.

Aspiculuris tetraptera : La sensibilité de cet oxyuridé à l'égard du composé étudié semble être beaucoup plus faible que celle de S. obvelata. En effet, moins de 17 p. 100 des souris traitées ont expulsé totalement leurs Aspiculuris.

En ce qui concerne Hymenolepis nana, deux expériences ont été effectuées :

Cinq souris traitées quotidiennement par 0,8 g / kg, pendant 6 jours ne sont pas déparasitées. Aucune réduction du nombre de vers n'est notée.

Neuf souris traitées par une dose journalière de 1,25 g / kg, pendant 6 jours, ne présentent également aucune déparasitation. Par contre, le taux de mortalité pour la souris est de 50 p. 100.

Nous pouvons conclure de cet ensemble de résultats que le 4,4' dihydroxydiphényl-trichloroéthane manifeste un pouvoir anthelminthique limité pour les oxyuridés de la souris, et nul vis à vis d'Hymenolepis nana, chez ce même animal. Bien que la toxicité de ce composé soit faible, l'impossibilité de déparasiter la totalité des souris réduit son intérêt.

TABLEAU II

ACTION DU 4,4',DIHYDROXYDIPHENYL-TRICHLOROETHANE SUR SYPHACIA OBVELATA

Essai n°	Lot	Nbre de souris	Nbre de traitements (1 tr./jour)	Dose par kg et par jour	Dose totale administrée (gr /Kg)	Nbre moyen de vers par souris	Pourcentage de déparasitation	Pourcentage de réduction	Mortalité
1	tem. trait.	7 10	5	1,50g	7,50g	24 3	61%	91%	60%
2	tem. trait.	7 8	6	0,75g	4,50g	73 12	62%	84%	0%
3	tem. trait.	7 9	4	1,10g	4,40g	113 6	42%	94%	22%
4	tem. trait.	5 8	4	1,0g	4,0g		53%		0%
3	tem. trait.	7 9	6	0,65g	3,90g	113 5	60%	95%	0%
5	tem. trait.	5 5	6	0,50g	3,0g	14 2	40%	85%	0%
5	tem. trait.	5 5	6	0,30g	1,80g	14 28	0%	0%	0%

TABLEAU III

ACTION DU 4,4',DIHYDROXYDIPHENYL-TRICHLOROETHANE SUR ASPICULURIS TETRAPTERA

Essai n°	Lot	Nbre de souris	Nbre de traitements (1 tr./jour)	Dose par kg et par jour	Dose totale administrée (gr/Kg)	Nbre moyen de vers par souris	Pourcentage de déparasitation	Pourcentage de réduction	Mortalité
1	tem. trait.	7 10	5	1,50g	7,50g	295 47	0%	84%	60%
2	tem. trait.	7 8	6	0,75g	4,50g	59 25	17%	58%	0%
3	tem. trait.	7 9	4	1,10g	4,40g	377 170	14%	55%	22%
4	tem. trait.	5 8	4	1,0g	4,0g	77 59	0%	23%	0%
3	tem. trait.	7 9	6	0,65g	3,90g	377 205	11%	45%	0%
4	tem. trait.	5 5	6	0,50g	3,0g	77 68	0%	12%	0%
4	tem. trait.	5 5	6	0,30g	1,80g	77 41	0%	47%	0%

CINQUIEME PARTIE

ETUDE EXPERIMENTALE

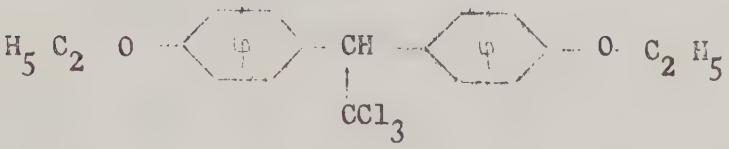
DU

4,4', DIETHOXYDIPHENYL-TRICHLOROETHANE

I

CARACTERES GENERAUX

La formule de ce composé est la suivante : $C_{18}\ H_{19}\ O_2\ Cl_3$



Il dérive donc de la substance précédente, le dihydroxydiphényl-trichloroéthane par éthérification des groupements hydroxyles fixés en para sur les noyaux phénoliques.

Poids moléculaire : 373,70

Point de fusion : 105° C (Banc de Kofler)

C'est une poudre blanche, microcristalline, insoluble dans l'eau, très peu soluble dans l'alcool à 95° (< 1 p. 100), soluble dans l'éther, peu soluble dans l'huile d'arachide (2 p. 100).

II

SYNTHESE

Nous avons effectué cette synthèse selon les indications données par DHINGRA (20).

Réactifs :

Chloral anhydre pur ;
Phénate d'éthyle ;
Acide sulfurique concentré pur ;
Acide acétique cristallisable pur.

Technique : Les modalités de préparation du 4,4', diéthoxydiphényl-trichloroéthane sont les mêmes que pour le 4,4', dihydroxydiphényl-trichloroéthane. Cependant, la substance mise en présence du chloral n'est plus ici le phénol mais le phénate d'éthyle, et les proportions à utiliser sont les suivantes :

Chloral anhydre..... 60,45 grammes
Phénate d'éthyle..... 100 grammes

Purification : Effectuer des cristallisations répétées du produit dans l'alcool à 95°.

III
TOXICITE AIGUE

Nous avons effectué successivement des essais de toxicité du produit seul et en présence d'huile d'arachide.

1° - Toxicité du produit seul

Par suite de sa très faible toxicité, nous avons limité cette étude aux essais suivants :

Chez un premier lot de 10 souris chaque animal reçoit une dose de 5 g / kg (soit 2 traitements de 0,5 ml d'une suspension à 10 p. 100, à 1 heu d'intervalle). Résultat : 1 souris décédée sur 10.

Chez un deuxième lot identique au premier, chaque souris reçoit une dose de 7,50 g / kg (soit 2 traitements de 0,75 ml de la suspension à 10 p. 100 à 1 heure d'intervalle). Résultat : 1 souris décédée sur 10.

La viscosité de la suspension et la trop grande quantité à administrer ne nous ont pas permis d'expérimenter des doses supérieures : la D.L. 50 du diéthoxydiphényl-trichloroéthane est donc trop faible pour pouvoir être calculée.

2° - Toxicité du produit en présence d'huile d'arachide

Nous avons utilisé la substance étudiée en suspension à des

concentrations allant de 2,5 à 10 p. 100 et les volumes donnés aux souris sont compris entre 0,20 et 0,50 ml.

La prise du produit est précédée de l'administration à l'animal, 10 minutes auparavant, de 0,2 ml d'huile d'arachide.

Les résultats sont les suivants :

Dose (en grammes par kg)	Nombre de souris en expérience	Nombre de souris tuées
0,125 g	10	1
0,250 g	10	4
0,500 g	10	9
1,000 g	10	10

Dose létale 50 du diéthoxydiphényl-trichoroéthane en présence d'huile

(calculée selon la formule indiquée par BEHRENS et KAERBER)

Doses en g par kg d'animal	0,125	0,250	0,500	1,000
Différence entre deux doses successives = b	0,125	0,250	0,500	
Nombre d'animaux traités = m.....	10	10	10	10
Nombre de morts.....	1	4	9	10
Moyenne de la somme des morts à deux doses successives = a.....	2,5	6,5	9,5	
a x b.....	0,312	1,625	4,750	

Dose toujours mortelle = Df = 1 g par kilogramme

Dose mortelle médiane = $Dm = Df - \frac{\Sigma (a \times b)}{m} = 1 - \frac{6,68}{10} = 0,332$

Dm = 0,332 g par kilogramme

L'adjonction d'huile d'arachide provoque donc une augmentation considérable de la toxicité du diéthoxydiphényl-trichloroéthane. Cette modification semble avoir pour cause première la solubilisation du composé dans le tube digestif, au contact de l'huile. De plus, le produit agissant seul ou en présence d'élément lipidique, toutes les souris présentent,

quelques heures après le traitement, des manifestations tétaniformes rappelant celles provoquées par le D.D.T. et qui évoluent rapidement, soit vers la guérison totale, soit vers la mort de l'animal.

IV

ACTIVITE ANTHELMINTHIQUE

Nous avons, par suite des modifications profondes de la toxicité en présence d'huile, étudié l'activité du diéthoxydiphényl-trichloroéthane, d'une part seul, et d'autre part, en présence d'huile d'arachide. L'huile est administrée à raison de 0,2 ml, 10 minutes avant le traitement proprement dit.

Nous avons réuni dans le tableau IV l'ensemble des résultats obtenus. Ils nous permettent de faire les constatations suivantes :

A l'égard de Syphacia obvelata, le diéthoxydiphényl-trichloroéthane semble actif ; il est, en effet, nécessaire d'administrer une dose totale de 18 g par kg (soit 3 g par kg et par jour, pendant 6 jours) pour déparasiter 36 p. 100 des souris. De plus, le fait que cette dose se situe très près du seuil de toxicité (5 g / kg) limite là notre expérimentation. Si nous utilisons cette substance en association avec l'huile d'arachide, nous obtenons sensiblement le même résultat avec une concentration 75 fois plus faible, mais, comme précédemment, la toxicité limite les possibilités d'utilisation.

A l'égard d'Aspiculuris tetraptera et Hymenolepis nana, aucune action appréciable ne peut être observée, avec ou sans huile.

Le diéthoxydiphényl-trichloroéthane ne possède donc qu'une très faible activité sur les trois parasites envisagés. La comparaison de ces résultats à ceux obtenus précédemment avec le dihydroxydiphényl-trichloroéthane nous amène à constater que le blocage des groupements hydroxyles par des radicaux - $C_2 H_5$ s'accompagne d'une réduction importante du pouvoir anthelminthique, associée à une diminution de la toxicité.

ACTIVITE ANTHELMINTHIQUE DU 4,4',DIETHOXYDIPHENYL-TRICHLOROETHANE

Essai	Lot	Nbre de souris	Nbre de traitements (1 tr./jour)	Dose par kg et par jour	Dose totale administrée (gr /kg)	Nbre moyen de vers par souris	Pourcentage de déparasitation	Pourcentage de réduction	Mortalité
SYPHACIA OBVELATA									
Produit seul	tem. trait.	7 10	6	3,0g	18g	24 6	36%	75%	0%
Produit + huile d'arachide	tem. trait.	5 6	6	0,04g	0,24g	5 3	30%	40%	0%
	tem. trait.	5 6	6	0,02g	0,12g	5 28	0%	0%	0%
ASPICULURIS TETRAPTERA									
Produit seul	tem. trait.	7 10	6	3,0g	18g	295 179	10%	39%	0%
Pr. + H. d'arachide	tem. trait.	4 5	6	0,04g	0,24g	70 34	0%	51%	0%
HYMENOLEPIS NANA									
Produit seul	tem. trait.	3 4	6	3,0g	18g	16 13	0%	19%	0%
Pr. +H. d'ara.	tem. trait.	6 7	6	0,04g	0,24g	11 12	0%	0%	0%

SIXIEME PARTIE

ETUDE EXPERIMENTALE

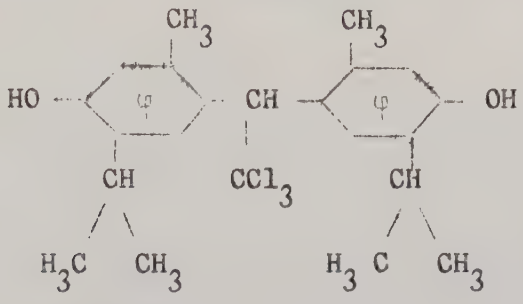
DU

DITHYMYL - TRICHLOROETHANE

I

CARACTERES GENERAUX

Ce composé répond à la formule suivante : $C_{22}\ H_{27}\ O_2\ Cl_3$



Poids moléculaire = 429

Point de fusion = 197° C (Banc de Kofler)

Ce corps se présente sous l'aspect d'une poudre blanche, microcristalline, inodore, sans saveur, non hygroscopique et non volatile à la température du Laboratoire.

Solubilité à 25° C. :

Eau.....	insoluble
Alcool à 95°.....	très soluble
Acétone.....	très soluble
Ether sulfurique.....	très soluble
Benzène.....	Soluble dans la proportion de 1,6 p. 10
Chloroforme.....	" " " 1 p. 10
Huile d'arachide.....	" " " 2,5 p. 10

II

SYNTHESE

La synthèse du dithymyl-trichloroéthane a été effectuée suivant une technique dérivée de celle décrite par JAGER (32).

Réactifs :

Thymol cristallisé pur ;
Chloral anhydre pur ;
Acide sulfurique concentré pur ;
Acide acétique cristallisable pur.

Technique : on met en présence 73,8 grammes de chloral anhydre avec 150 grammes de thymol. Le mélange liquide est introduit dans un flacon de KELL à deux tubulures que l'on plonge dans un bain réfrigérant (glace + chlorure de calcium). On ajoute goutte à goutte et très lentement, tout au moins au début de la réaction, 3 à 5 fois son volume d'un mélange composé d' 1 partie (en volume) d'acide acétique cristallisé et 3 parties (en volume) d'acide sulfurique concentré. Agiter constamment à l'aide d'un agitateur mécanique en veillant que la température ne dépasse pas 15° c. Le mélange s'épaissit progressivement pour former une masse résineuse ; cette phase dure plusieurs heures. On introduit cette masse, tout en agitant, dans un grand volume d'eau distillée maintenue au réfrigérateur (4 litres environ). Après repos de 24 heures, filtrer sur verre frité, sous aspiration.

Purification : le produit pulvérulent est lavé à l'eau distillée jusqu'à pH neutre. Parmi les méthodes de purification que nous avons essayées, notre choix a porté sur la suivante : on traite à chaud le produit pulvérulent séché par un mélange de benzène (1 volume) + chloroforme (2 volumes). Répéter l'extraction jusqu'à ce que le résidu d'évaporation des solvants ne présente plus les réactions caractéristiques du thymol. On fait alors cristalliser le produit dans le benzène

III
TOXICITE

Nous avons étudié successivement la toxicité aigüe et la toxicité chronique de cette substance chez l'animal.

A - Toxicité aigüe

Pour déterminer la toxicité du dithymyl-trichloroéthane chez la souris, nous l'avons utilisé en suspension à 10 p. 100 ; les volumes administrés varient de 0,6 ml à 2,4 ml, ce qui nous a obligés, à partir de la dose de 4 g / kg, à les fractionner en 2 ou 3 prises données à 1 heure d'intervalle. Nous avons obtenu les résultats suivants :

Dose (en grammes par kg)	Nombre de souris en expérience	Nombre de souris tuées
3 g	10	0
4 g	10	3
5 g	10	2
6 g	10	2
7 g	10	6
8 g	10	7
9 g	10	9
10 g	10	6
10 g	10	3
12 g	10	10

Dose létale 50 du dithymyl-trichloroéthane :

(calculée selon la formule de BEHRENS et KAERBER)

Dose en g par kg d'animal.....	3	4	5	6	7	8	9	10	12
Différence entre deux doses successives = b	1	1	1	1	1	1	1	2	
Nombre d'animaux traités = m.....	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Nombre de morts.....	0	3	2	2	6	7	9	5	10
Moyenne de la somme des morts à deux doses successives = a.....		1,5	2,5	2	4	6,5	8	7	7,5
a x b.....		1,5	2,5	2	4	6,5	8	7	15

Dose toujours mortelle = Df = 12 g par kilogramme.

Dose létale 50 : $Dm = Df - \frac{\Sigma(a \times b)}{m} = 12 - \frac{46,5}{10} = 7,35$

Dm = 7,35 g par kilogramme

Remarque : Des quantités importantes de suspension ayant été administrées aux animaux, nous avons également vérifié s'il n'existait pas une toxicité propre au sirop de sucre, à des doses élevées.

Pour cela, 10 souris de 20 g ont reçu chacune du sirop de sucre dilué (excipient utilisé pour la mise en suspension du produit) à raison de 2 ml donnés en 3 prises successives : seule une forte diarrhée, disparaissant 5 heures après l'ingestion, a pu être décelée.

Il est donc possible, pour les doses les plus élevées de dithymyl-trichloroéthane, que la diarrhée résultant des quantités importantes de sirop administrées limite la valeur des résultats.

Nous avons, d'autre part, déterminé sur un lot de 10 rats, de 80 g chacun la toxicité provoquée par une dose de 5 g / kg (soit une suspension à 10 p. 100 administrée à raison de 2 traitements de 2 ml chacun, à 1 heure d'intervalle). Ce traitement a provoqué la mort de 3 rats. Ce résultat correspond à la mortalité obtenue dans l'expérience précèdente, chez la souris.

B - Toxicité chronique

Nous avons effectué trois séries d'expériences ; les deux premières sont réalisées chez la souris et la troisième chez le rat.

1 - Toxicité chronique chez la souris

a) Modalités de l'expérimentation : 17 souris reçoivent quotidiennement, pendant une durée de 1 mois, 0,25 ml d'une suspension de dithymyltrichloroéthane à 4 p. 100, soit environ 0,50 g de produit par kg et par jour. Nous avons administré parallèlement à des souris témoins la même quantité de sirop de sucre ayant servi à préparer la suspension.

Sur les animaux traités et les témoins, nous avons effectué les contrôles suivants :

Etude des variations pondérales : chaque lot est pesé avant le début du traitement, puis régulièrement toutes les semaines, jusqu'à la fin de l'expérience.

Numération des globules rouges, des globules blancs et formule hémoleucocytaire, au début et à la fin du traitement.

Examen anatomo-pathologique, pour chaque souris, des organes suivants foie, estomac, intestin grêle, côlon, rein.

b) Résultats

Lots témoins	N° 1 = 10 souris
	N° 3 = 10 souris
Lots traités	N° 2 = 9 souris
	N° 4 = 8 souris

N.B. : Les lots 1 et 2, d'une part, 3 et 4, d'autre part, se correspondent. Cette double expérimentation a été nécessitée par une certaine mortalité apparue lors d'une première série expérimentale (lots n° 1 et 2), décès que les examens anatomo-pathologiques semblent attribuer à une cause infectieu

Mortalité

Lot n° 1 (Témoins) : pas de mortalité.
Lot n° 2 (Traitement) : 2 morts
1 souris morte 1 jour après la fin du traitement.
1 souris morte 4 jours après la fin du traitement.
Lot n° 3 (Témoins) : pas de mortalité.
Lot n° 4 (Traitement) : pas de mortalité.

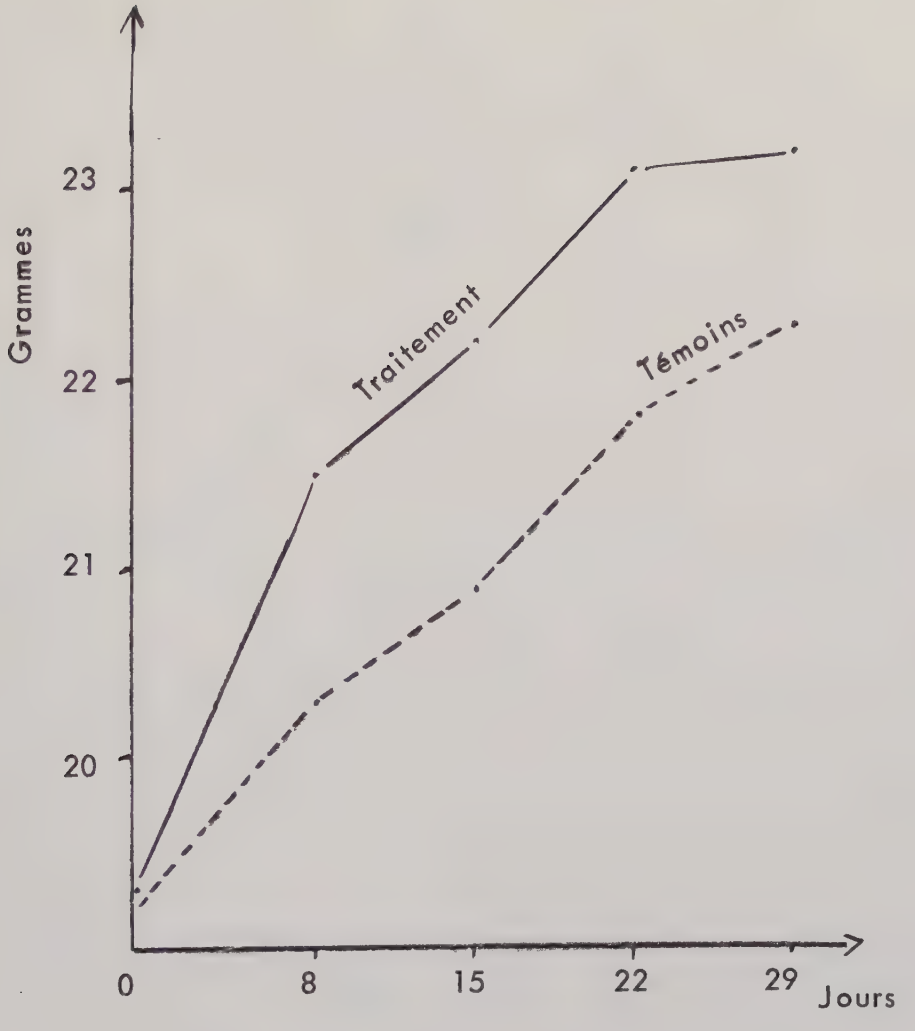
Courbes de poids

Poids moyen par souris (en grammes)

Date	Témoins n° 1	Traitement n° 2
22.9.64	19,2	19,3
30.9.64	20,3	21,5
7.10.64	20,9	22,2
14.10.64	21,8	23,1
21.10.64	22,3	23,2
Augmentation de poids	16,1 %	20,2 %

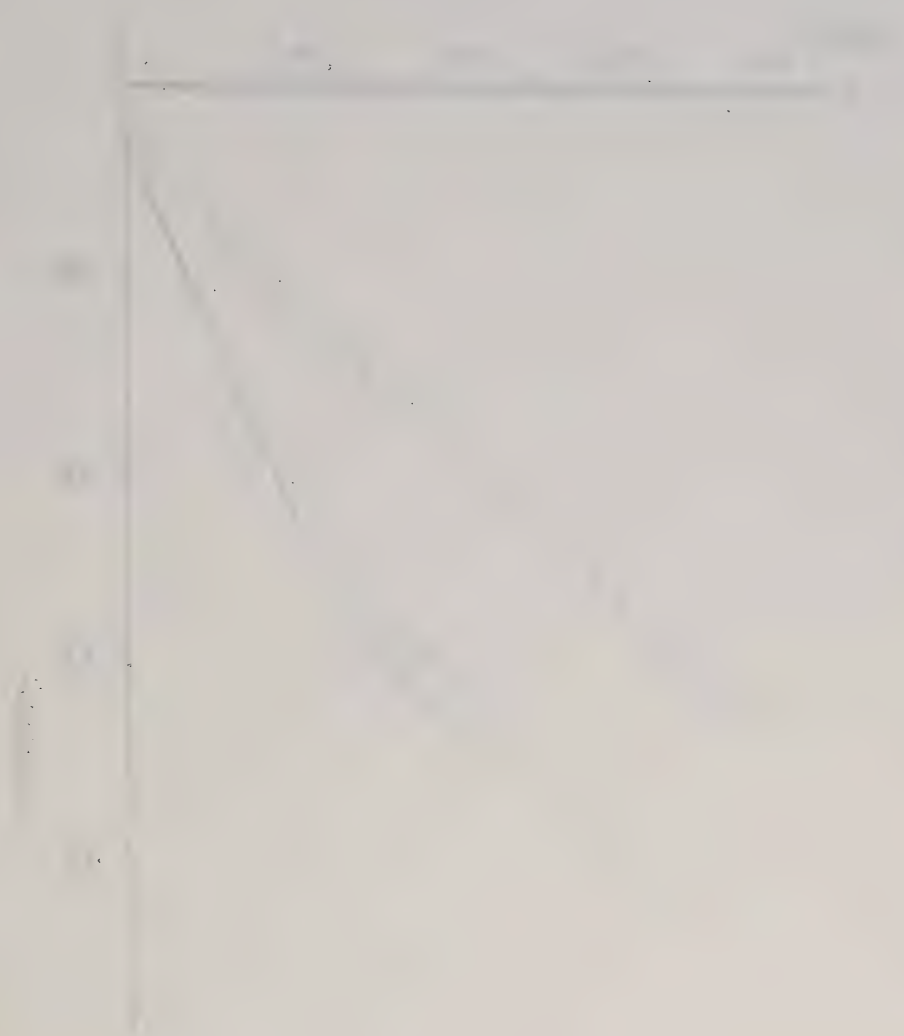
Date	Témoins n° 3	Traitement n° 4
15.1.65	27,5	25,2
22.2.65	27,9	25,8
29.1.65	29,1	27,1
5.2.65	30	27,5
12.2.65	30,6	27,6
Arrêt du traitement		
18.2.65	30,9	30,1
Augmentation de poids		
12.2.65	10,8 %	9,5 %
18.2.65	11,9 %	19,4 %

A ces résultats correspondent les courbes ci-après (courbes 2 et 3)



Courbe 2

Courbes de variations pondérales des Souris traitées par le dithymyl-trichloroéthane (0,50 g par Kg et par jour)- Lots n°1 et 2



Courbe 3

Courbes de variations pondérales des Souris traitées par le dithymyl-trichloroéthane (0,50 g par Kg et par jour) - Lots n°3 et 4.

Les courbes de croissance des lots 1 et 2 sont normales. Celles des lots 3 et 4 présentent une inhibition de la prise de poids chez les animaux traités, au cours du traitement ; mais ce retard est largement rattrapé dans la semaine qui suit la fin de l'expérience.

Numération des Globules rouges et des Globules blancs

		Lot n° 1 Souris témoins	Lot n° 2 Souris traitées
Nombre moyen de G.R. par mm3 de sang et par souris	avant le traitement.....	8.129.000	7.829.000
	après le traitement.....	8.275.000	8.285.000
Nombre moyen de G.B. par mm3 de sang et par souris	avant le traitement.....	10.496	11.238
	après le traitement.....	12.487	12.651

Formule hémoleucocytaire

Avant le traitement	Polynucléaires neutrophiles.....	39 p. 100	42 p. 100
	" éosinophiles.....	3 p. 100	3 p. 100
	" basophiles.....	0 p. 100	0 p. 100
	Lymphocytes.....	55 p. 100	50 p. 100
	Monocytes.....	3 p. 100	5 p. 100
Après le traitement	Polynucléaires neutrophiles.....	31 p. 100	40 p. 100
	" éosinophiles.....	5 p. 100	3 p. 100
	" basophiles.....	0 p. 100	0 p. 100
	Lymphocytes.....	59 p. 100	54 p. 100
	Monocytes.....	5 p. 100	3 p. 100

Ces résultats ne montrent aucune altération de la numération globulaire ni de la formule hémoleucocytaire chez les animaux traités.

Examen anatomo-pathologique

Cinq jours après la fin du traitement, 5 souris de chaque lot témoin et toutes les souris ayant reçu le produit sont sacrifiées et autopsiées. Sur les animaux des lots 1 et 2, nous prélevons les organes suivants (foie, rein, estomac, intestin grêle et côlon) qui sont ensuite soumis à une étude anatomo-pathologique ; pour les lots 3 et 4, seul le foie fait l'objet des mêmes examens.

Les conclusions sont les suivantes :

Lot témoin n° 1

Aspect macroscopique : pas d'anomalies.

Foies : on note, chez les 5 souris, des lésions discrètes d'hépatose (fait à peu près constant chez les rongeurs) et, chez 1 souris des lésions d'hépatite interstitielle d'origine infectieuse.

Reins : ils présentent quelques lésions de cadavérisation rénale.

Les muqueuses de l'estomac, de l'intestin grêle et du côlon sont normales.

Lot traité n° 2

Aspect macroscopique : pas d'anomalies.

Foies : 5 souris sur 7 présentent des lésions d'hépatite interstitielle d'origine infectieuse, aigüe et massive chez deux d'entre elles. Chez les deux autres souris on remarque une dégénérescence granuleuse des hépatocytes (fait à peu près constant chez les rongeurs).

Reins : ils présentent les habituelles manifestations de cadavérisation des tubes épithéliaux, d'une intensité égale à celle des témoins.

Les muqueuses de l'estomac, de l'intestin grêle et du côlon sont normales.

Lot témoin n° 3 : l'examen des foies montre un aspect granuleux des cytoplasmes des hépatocytes (fait constant chez les rongeurs).

Lot traité n° 4 : Les foies de 2 souris présentent une altération granulo-graisseuse des cytoplasmes supérieure en intensité à celle des 6 autres et à celle des témoins (origine infectieuse).

De cette étude sur la toxicité chronique du dithymyl-trichloroéthane, chez la souris, nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

L'administration, pendant 1 mois, d'une dose journalière de 0,50 g / kg de dithymyl-trichloroéthane entraîne, dans une première série d'expériences (lots 1 et 2), le décès de 22 p. 100 des animaux ; mais, lors de l'examen anatomo-pathologique, les foies des souris mortes présentent des lésions d'origine infectieuse qui ne permettent pas d'attribuer la mortalité survenue à une simple toxicité du produit. Une deuxième série expérimentale (lots 3 et 4), effectuée dans les mêmes conditions, ne montre aucun trouble toxique caractérisable.

Dans les deux cas, aucune lésion macroscopique ou anatomique d'origine toxique n'a pu être décelée chez les organes prélevés. De même il n'a été noté aucune altération sanguine (seuls les lots 1 et 2 ont été soumis à cette étude).

En ce qui concerne la courbe de croissance, la prise de poids du premier lot traité est normale ; le deuxième lot traité présente, par contre, une certaine stabilité pondérale, mais cette dernière reste très peu marquée et facilement réversible.

2 - Toxicité chronique chez le rat

a) Modalités de l'expérimentation : le traitement consiste à administrer à un lot homogène de 5 rats, pendant 26 jours, une quantité de produit correspondant à une dose journalière de 0,50 g / kg (soit, pour un rat de 80 g, 1 ml d'une suspension de dithymyl-trichloroéthane à 4 p. 100). Parallèlement, un lot homogène de 5 rats témoins reçoit la même quantité de sirop de sucre dilué utilisé pour la mise en suspension du produit. Dans les

deux cas, les quantités administrées ont été modifiées au cours de l'expérien en fonction de la variation de poids de chaque animal.

Nous avons, de plus, effectué sur les rats traités et les témoins les contrôles suivants :

Etude des variations pondérales.

Examen anatomo-pathologique des organes suivants : foie, rein, estomac, intestin grêle, côlon.

b) Résultats

Lots n° 1 : 5 rats témoins,
Lots n° 2 : 5 rats traités.

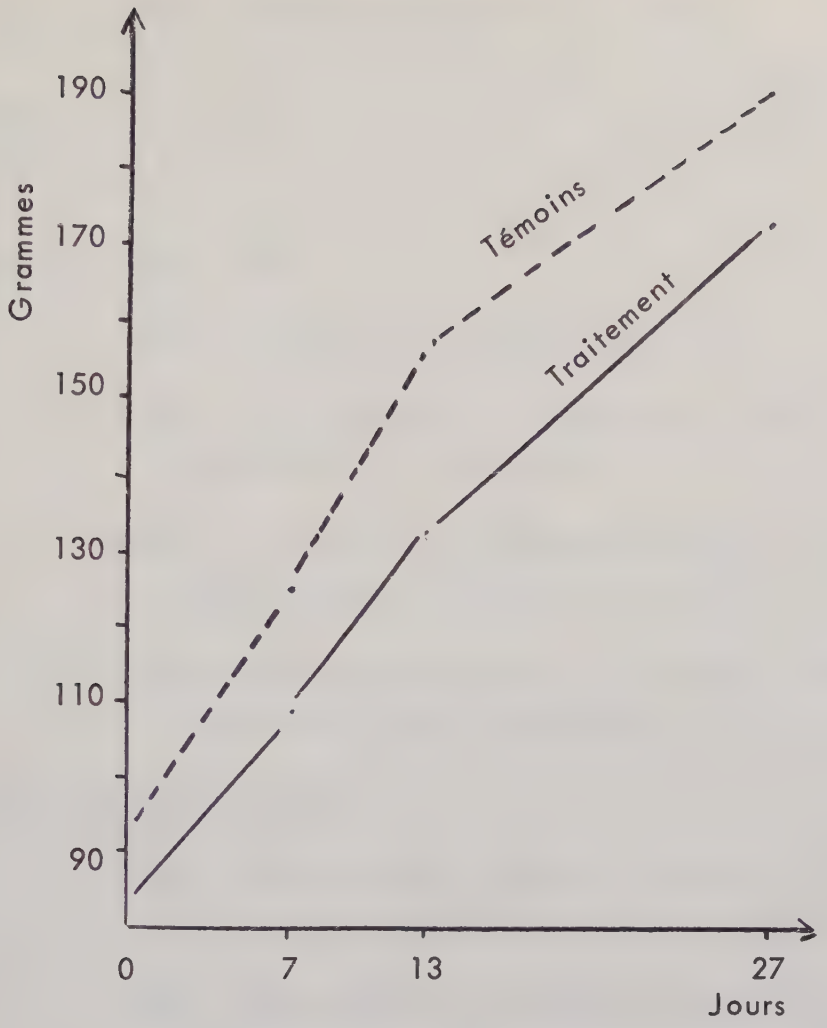
Mortalité - Lots n° 1 et 2 : aucune mortalité.

Etude des courbes de poids

	Poids moyen par rats (en grammes)	
Date	Témoins	Traitement
3.2.65	92,8	83,4
10.2.65	125	109
16.2.65	157,4	132,6
Arrêt du traitement le 28.2.65		
1.3.65	191	173,4
Augmentation de poids		
1.3.65	105,8 %	107,9 %

A ces résultats correspondent les courbes ci-après (courbe 4)

La courbe de croissance des animaux traités est normale par rappor à celle des témoins.



Courbe 4

Courbes de variations pondérales des Rats traités par le dithymyl-trichloroéthane (0,50 g par Kg et par jour).

Examen anatomo-pathologique des organes

Tous les rats témoins et traités sont sacrifiéset autopsiés 6 jours après la fin du traitement. Les organes prélevés sont soumis à un examen anato pathologique dont les résultats sont les suivants :

Lot n° 1 : rats témoins

Aspect macroscopique : pas d'anomalies .

Foies : ils présentent une altération granulo-graisseuse des cytoplasmes des hépatocytes.

Reins : on note les phénomènes habituels de cadavérisation localisés essentiellement au niveau des cellules des tubes contournés.

Les muqueuses de l'estomac, de l'intestin grêle et du côlon sont normales chez tous les animaux.

Lot n° 2 : rats traités

Foies : mêmes remarques que pour les foies des témoins ; il n'existe pas de prédominance de ces aspects chez les animaux traités.

Reins : mêmes remarques que pour les reins des témoins, sans aucune accentuation des nécroses cellulaires chez les animaux traités.

Estomac : les muqueuses sont normales chez tous les animaux.

Intestin grêle : 1 rat sur 5 présente une considérable infiltration réactionnelle en îlots multiples de la muqueuse du chorion, avec présence de plasmocytes, d'histiocytes, de polynucléaires et quelques éosinophiles. Il parait s'agir d'une manifestation d'ordre inflammatoire dont la présence chez un seul sujet traité ne semble pas devoir intervenir dans la conclusion de l'expérien

Côlon : les structures sont normales chez tous les animaux.

Cette expérimentation chez le rat n'entraîne, comme dans la deuxième série d'expériences effectuées chez la souris, aucune mortalité ni aucune lésion macroscopique ou anatomique d'origine toxique chez les organes prélevés. La courbe de croissance des rats traités est, de plus, normale.

Nous pouvons ainsi conclure que l'administration au rat et à la souris, pendant environ 30 jours, d'une quantité de dithymyl-trichloroéthane correspondant à une dose quotidienne de 0,50 g / kg, n'entraine pas de mortalité et ne provoque aucune intoxication caractérisable. Seule une légère stabilité pondérale s'est manifestée chez un des 3 lots traités.

IV

ACTIVITE ANTHELMINTHIQUE

Les résultats que nous avons obtenus à l'égard des 3 parasites envisagés sont rapportés dans les tableaux ci-après (tableau V, VI et VII).

Nous avons également essayé à l'égard d'Hymenolepis nana un mode particulier de traitement inspiré de celui décrit par CAVIER (11) :

Les souris infestées par H. nana sont laissées à jeun, la nuit précédant le traitement ; seule reste à leur disposition comme boisson, une solution de saccharose à 5 p. 100. D'autre part, l'administration du produit à étudier est suivie, quelques heures après, de l'ingestion d'un purgatif salin destiné à favoriser l'expulsion du parasite.

Nous avons effectué les essais suivants :

Un premier lot de 3 souris reçoit, en un seul traitement, une quantité de dithymyl-trichloroéthane en suspension correspondant à une dose de 1,50 g / kg ; puis, 4 heures après, on administre à chaque souris 0,25 ml d'une solution à 10 p. 100 de sulfate de sodium officinal ($SO_4 Na_2, 10H_2O$).

Un deuxième lot de 5 souris reçoit la même dose de dithymyl-trichloroéthane que précédemment, mais la quantité de sulfate de sodium administrée 4 heures après est 2 fois plus faible (soit 0,25 ml d'une solut à 5 p. 100 de sulfate de sodium officinal).

L'autopsie des animaux, pratiquée 3 jours plus tard, nous donne les résultats suivants :

Dans le 1er lot, une souris sur trois est entièrement déparasitée.

Dans le 2ème lot, aucune souris n'est déparasitée.

A l'ensemble des résultats obtenus avec le dithymyl-trichloroéthane correspondent les courbes ci-après (courbe 5).

Précisons les résultats obtenus sur chacun des trois helminthes utilisés :

Syphacia obvelata : la dose totale de 4,50 g / kg, soit 0,75 g / kg et par jour pendant 6 jours, permet de déparasiter la totalité des animaux. Elle se situe cependant assez près du seuil de toxicité du produit ; l'administration de 1,25 g par kg et par jour pendant 6 jours provoque, en effet, une mortalité de 16 p. 100 . Mais le dithymyl-trichloroéthane conserve une activité importante à des doses très inférieures : il détermine une réduction du nombre de parasites supérieure à 80 p. 100 à partir de la dose totale de 0,60 g / kg, soit 0,10 g. par kg et par jour pendant 6 jours.

Aspiculuris tetraptera : Aucun essai, même l'administration de 1,25 g par kg et par jour qui entraine 16 p. 100 de mortalité au bout de 6 jours, ne permet de déparasiter la totalité des souris en expérience. La zone optimum d'activité semble se situer entre 3 g et 5,40 g par kg, la dose totale de 4,50 g / kg permettant de déparasiter 66 p. 100 des souris, chiffre qui n'a pu être dépassé pour cet oxyuridé.

En ce qui concerne la réduction du nombre de vers, elle est très marquée pour des doses allant de 2 g / kg à 6 g / kg ; le pourcentage de réduction s'y maintient, en effet, entre 80 et 99 p. 100.

Hymenolepis nana : seule l'administration de 7,50 g / kg de produit déparasite un pourcentage appréciable de souris (83 p. 100), mais avec une mortalité de 17 p. 100.

TABLEAU V

ACTION DU DITHYMYL-TRICHLOROETHANE SUR SYPHACIA OBVELATA

Essai n°	lots	Nbre de souris	Nbre de traitements (1 tr./jour)	Dose par kg et par jour	Dose totale administrée (gr/Kg)	Nbre moyen de vers par souris	Pourcentage de déparasitation	Pourcentage de réduction	Mortalité
1	tém.	5	3	1,80g	5,40g	101	100%	100%	50%
	trait.	10				0			
2	tém.	5	6	0,75g	4,50g	61	100%	100%	0%
	trait.	6				0			
	tém.	5	6	0,50g	3,0g	61	71%	90%	0%
	trait.	7				6			
3	tém.	5	2	1,0g	2,0g	23	83%	96%	0%
	trait.	6				1			
4	tém.	11	6	0,25g	1,5g	45	55%	93%	0%
	trait.	11				3			
	tém.	11	6	0,10g	0,60g	45	45%	84%	0%
	trait.	11				7			
5	tém.	11	6	0,05g	0,30g	41	24%	24%	0%
	trait.	12				31			
6	tém.	5	6	0,025g	0,15g	29	0%	0%	0%
	trait.	5				57			

TABLEAU VI

ACTION DU DITHYMYL-TRICHLOROETHANE SUR ASPICULURIS TETRAPTERA

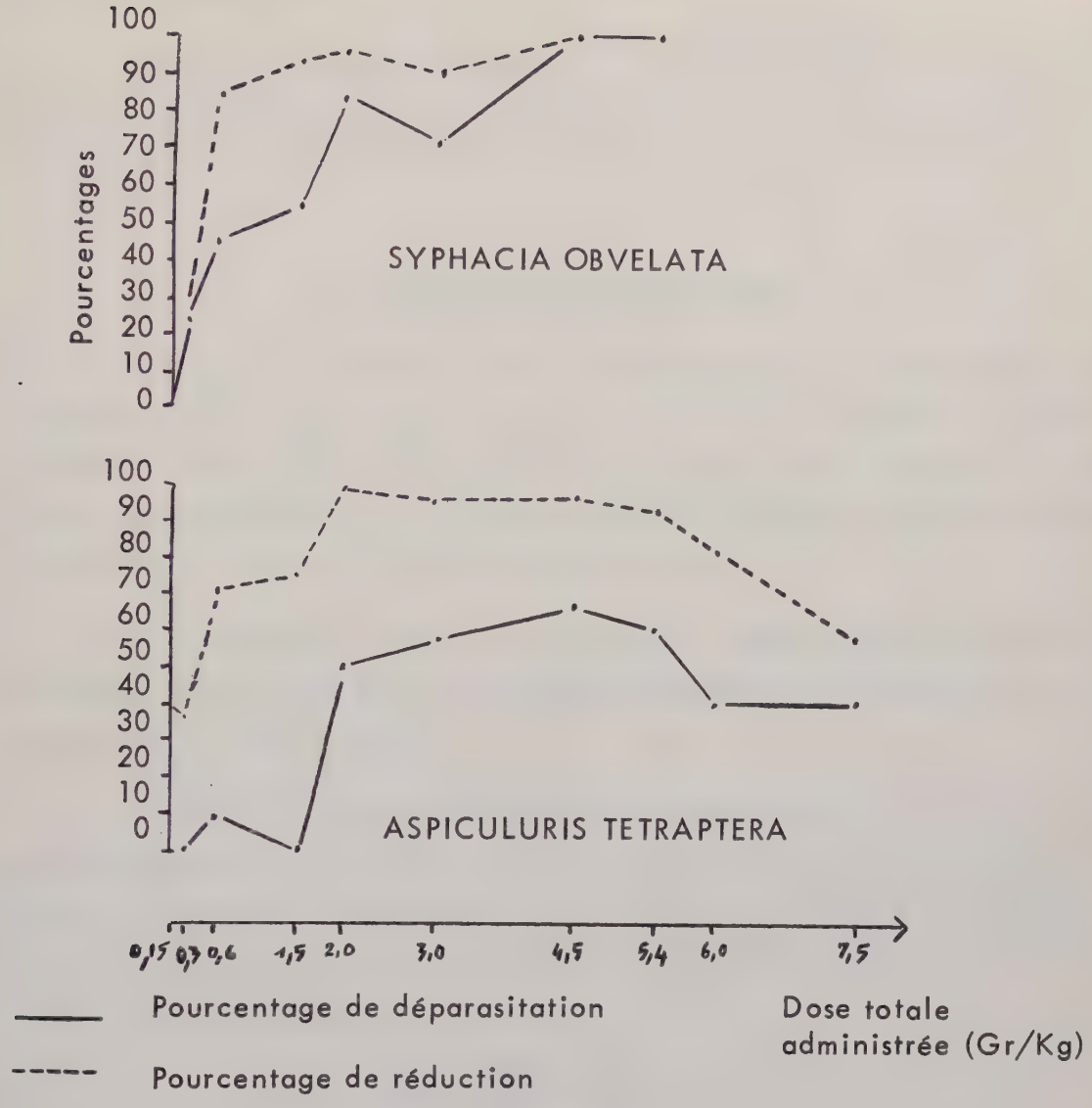
Essai n°	Lot	Nbre de souris	Nbre de traitements (1 tr./jour)	Dose par kg et par jour	Dose totale administrée (gr/kg)	Nbre moyen de vers par souris	Pourcentage de déparasitation	Pourcentage de réduction	Mortalité
1	tém.	5	6	1,25g	7,50g	65	40%	58%	16%
	trait.	6				27			
	tém.	5	6	1,0g	6,0g	65	40%	81%	0%
	trait.	5				12			
2	tém.	5	3	1,80g	5,40g	238	60%	92%	50%
	trait.	10				18			
3	tém.	6	6	0,75g	4,50g	378	66%	96%	0%
	trait.	6				17			
	tém.	6	6	0,50g	3,0g	378	57%	95%	0%
	trait.	7				20			
4	tém.	5	2	1,0g	2,0g	104	50%	98%	0%
	trait.	6				2			
5	tém.	11	6	0,25g	1,50g	112	0%	75%	0%
	trait.	11				28			
	tém.	11	6	0,10g	0,60g	112	9%	71%	0%
	trait.	11				32			
6	tém.	11	6	0,05g	0,30g	176	0%	36%	0%
	trait.	12				113			
7	tém.	5	6	0,025g	0,15g	366	0%	39%	0%
	trait.	5				221			

TABLEAU VII

ACTION DU DITHYMYL-TRICHLOROETHANE SUR HYMENOLEPIS NANA

Essai n°	Lot	Nbre de souris	Nbre de traitements (1 tr./jour)	Dose par kg et par jour	Dose totale administrée (gr/Kg)	Nbre moyen de vers par souris > 2cms	Nbre moyen de vers par souris < 2cms	Pourcentage de déparasitation	Pourcentage de réduction > 2cms	Pourcentage de réduction < 2cms	Mortalité
1	tém.	4	6	1,25g	7,50g	1	3	83%	100%	67%	17%
	trait.	6				0	1				
	tém.	4	6	1,0g	6,0g	1	3	20%	0%	0%	0%
	trait.	5				1	7				
2#	trait.	2	6	0,5g	3,0g			0%			0%

Traitement effectué lors des essais préliminaires : il ne comporte pas de lot témoin et, de plus, les animaux ont subi uniquement une coprologie de contrôle en fin d'expérience.



Courbe 5

Activité anthelminthique du dithymyl-trichloroéthane à l'égard de S. obvelata et A. tetraptera.

Nous pouvons conclure de cet ensemble de résultats que le dithymyl-trichloroéthane est actif sur les oxyuridés de la souris et, en particulier, sur Syphacia obvelata.

Ainsi, ce composé, associant à une faible toxicité un pouvoir anthelminthique élevé, possède une valeur certaine qu'il est cependant nécessaire de préciser en déterminant son coefficient chimiothérapique.

V

COEFFICIENT CHIMIOTHERAPIQUE

Résultat final d'une étude pharmacologique le coefficient chimiothérapique C/T s'exprime par le rapport de la dose curative C à la dose toxique T, toutes deux déterminées chez une même espèce animale. Il permet donc de connaître la marge de sécurité dont on dispose lors de l'utilisation éventuelle du produit en thérapeutique humaine.

La détermination de ce coefficient, dans le cas du dithymyl-trichloroéthane, n'a de sens que pour Syphacia obvelata, seul parasite dont l'éradication a pu être obtenue.

Les différents essais effectués montrent que la dose curative chez la souris s'élève à 0,75 g par kilogramme et par jour. La dose mortelle médiane (D.L. 50), calculée selon la formule de BEHRENS et KAERBER est de 7,35 g par kilogramme. Le coefficient chimiothérapique s'établit donc à la valeur suivante :

$$C/T = \frac{0,75}{7,35} = \frac{1}{9,8}$$

VI

ETUDE COMPAREE DU THYMOL

Le thymol étant le principal constituant du dithymyl-trichloroéthane nous avons étudié ce composé à titre de comparaison, dans les mêmes conditions que précèdemment.

Il faut cependant mentionner que le sirop de sucre ne convient pas à l'obtention d'une suspension satisfaisante de thymol pulvérisé ; celle-ci peut être préparée par utilisation du mélange suivant :

Solution aqueuse de gomme arabique à 20 p. 100..... 6 ml
Eau distillée..... q. S. p. 100 ml

A - TOXICITE AIGUE

Comme le font remarquer CAUJOLLE et FRANCK (9), les données de différents auteurs sur la toxicité du thymol sont peu homogènes et varient sensiblement suivant l'animal utilisé : ELLINGER (1923) trouve, chez la souris, la dose mortelle de thymol en solution dans l'huile, à 0,80 g / kg.

Dans nos expériences, nous avons utilisé le thymol en suspension à des concentrations variant de 2,5 à 10 p. 100 et les quantités administrées sont comprises entre 0,20 et 0,50 ml.

Nous avons obtenu les résultats suivants :

Doses en g par kg d'animal....	0,25	0,5	1	1,5	2	2,5
Différence entre deux doses successives = b...		0,25	0,5	0,5	0,5	0,5
Nombre d'animaux traités = m..	10	10	10	10	10	10
Nombre de morts.....	0	1	5	7	8	10
Moyenne de la somme des morts à deux doses successives = a..		0,25	3	6	7,5	9
a x b.....		0,125	1,5	3	3,75	4,5

Dose toujours mortelle = Df = 2,50 g par kilogramme

$$\text{Dose létale 50} = Dm = Df - \frac{\Sigma(a \times b)}{m} = 2,5 - \frac{12,87}{10}$$

$$Dm = \underline{1,21 \text{ g par kilogramme}}$$

B - ACTIVITE ANTHELMINTHIQUE

THOMPSON et REINERTSON (52) ont étudié l'activité anthelminthique du thymol chez la souris parasitée spontanément par Aspiculuris tetraptera et Syphacia obvelata. Ils indiquent que la dose de 1,6 g par kg et par jour,

pendant 6 jours, n'entraîne aucune déparasitation des souris, aussi bien pour S. obvelata que pour A. tetraptera, mais tue 10 p. 100 des animaux.

Les résultats que nous avons obtenus au cours de notre expérimentation sont réunis dans le tableau ci-après (tableau VIII). Ils confirment ceux de THOMPSON et REINERTSON à savoir l'inactivité du thymol sur S. obvelata et A. tetraptera. Ce composé est également totalement inactif à l'égard d'Hymenolepis nana.

La comparaison de ces résultats à ceux obtenus précèdemment met en évidence l'intérêt de l'utilisation du thymol sous forme de dithymyltrichloroéthane. Cette dernière substance est, en effet, par rapport au thymol, non seulement beaucoup moins toxique pour l'hôte, mais également active sur les oxyuridés de la souris.

ACTIVITE ANTHELMINTHIQUE DU THYMOL

Essai n°	lots	Nbre de souris	Nbre de traitements (1 tr./jour)	Dose par kg et par jour	Dose totale administrée (gr/kg)	Nbre moyen de vers par souris	Pourcentage de déparasitation	Pourcentage de réduction	Mortalité
SYPHACIA OBVELATA									
1	tém.	18	6	0,20g	1,20g	28	0%	0%	0%
	trait.	16				45			
2	tém.	11	6	0,10g	0,60g	78	33%	71%	0%
	trait.	6				23			
	tém.	11	6	0,05g	0,30g	78	0%	65%	0%
	trait.	6				27			
ASPICULURIS TETRAPTERA									
1	tém.	18	6	0,20g	1,20g	135	0%	27%	0%
	trait.	16				99			
2	tém.	13	6	0,10g	0,60g	133	0%	0%	0%
	trait.	6				140			
	tém.	13	6	0,05g	0,30g	133	0%	43%	0%
	trait.	8				76			
HYMENOLEPIS NANA									
1	tém.	7	6	0,20g	1,20g	8	0%	0%	0%
	trait.	7				8			
2	tém.	4	6	0,10g	0,60g	1	0%	0%	0%
	trait.	3				22			
	tém.	4	6	0,05g	0,30g	1	0%	0%	0%
	trait.	5				2			

SEPTIEME PARTIE

SYNTHESE DES RESULTATS OBTENUS.

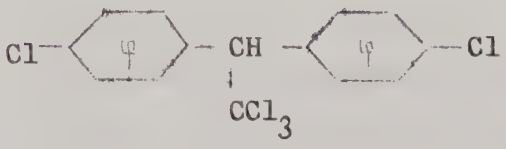
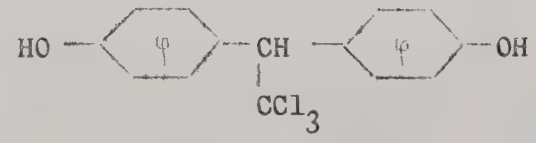
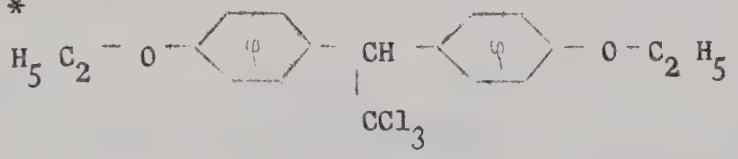
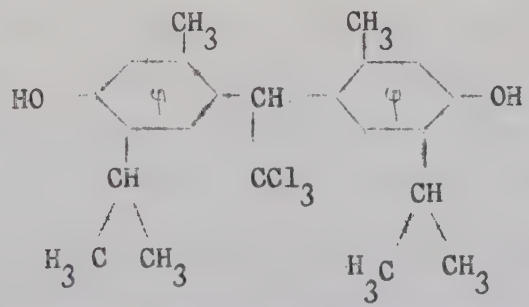
ETUDE COMPARATIVE.

Dans cette dernière partie, nous étudions comparativement les différents résultats obtenus au cours de notre travail expérimental, afin de déterminer l'influence exercée sur la toxicité et l'activité de la molécu de diphényl-trichloroéthane par la nature des substituants fixés sur les noyaux phényls. Puis nous essaierons, plus particulièrement, de préciser la valeur anthelminthique et l'intérêt que le dithymyl-trichloroéthane est susceptible de présenter en thérapeutique humaine.

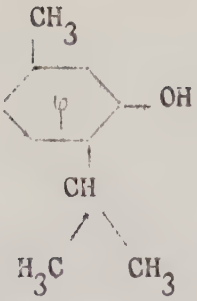
I

TOXICITE

Les doses mortelles médianes (D.L. 50) que nous avons déterminées chez la souris sont les suivantes :

Produits	Formules	D.L. 50 (g / kg)
4,4' DICHLORO DIPHENYL - TRICHLOROETHANE (D.D.T.)		0,537 g
4,4' DIHYDROXY-DIPHENYL - TRICHLOROETHANE		3,20 g
4,4' DIETHOXY-DIPHENYL - TRICHLOROETHANE *		> 8,0 g
DITHYMYL-TRICHLOROETHANE		7,35 g

* La D.L. 50 de ce même produit en présence d'huile d'arachide est la suivan 0,332 g / kg.

		D.L.50 (g / kg)
THYMOL		1,21 g

Ces résultats mettent en évidence la forte variation de toxicité existant, d'une part, entre le D.D.T. et les trois autres dérivés de substitution du diphényl-trichloroéthane et, d'autre part, entre le dithymyl-trichloroéthane et le thymol.

Ainsi, dans nos expériences, la présence d'atomes de chlore en para sur les noyaux aromatiques semble conférer à la molécule de diphényl-trichloroéthane une toxicité maximum. Le remplacement du chlore par des groupements hydroxyles s'accompagne d'une diminution importante de la toxicité. Le blocage de ces groupements hydroxyles libres par des radicaux C_2H_5 provoque une réduction encore plus marquée du pouvoir toxique, mais seulement en l'absence d'huile ; en effet, l'introduction d'huile d'arachide dans le milieu accroit considérablement l'action létale de cette dernière substance.

Le dithymyl-trichloroéthane, correspondant à la fixation sur les noyaux du diphényl-trichloroéthane des groupements caractéristiques du thymol, est très peu toxique : la dose mortelle médiane de ce produit est 6 fois plus faible que celle du thymol.

II

ACTIVITE ANTHELMINTHIQUE

Nous avons testé l'activité de ces composés à l'égard de trois parasites de la souris ; deux oxyuridés, Syphacia obvelata et Aspiculuris tetraptera et un Cestode, Hymenolepis nana. Les résultats les plus significatifs obtenus avec chacune des substances étudiées sont condensés dans les tableaux IX et X.

Syphacia obvelata : l'action du D.D.T. à l'égard de ce parasite est pratiquement nulle. Par contre, les dérivés hydroxylé et éthoxylé manifestent une certaine activité, surtout marquée pour le composé hydroxylé. Mais aucune dose ne permet d'atteindre la déparasitation totale des animaux traités.

TABLEAU IX

ACTIVITE ANTHELMINTHIQUE DES DIFFERENTS COMPOSES ETUDIES SUR SYPHACIA OBVELATA

	Pourcentages de déparasitation							Pourcentages de réduction						
Dose totale administrée (g/kg)	0,15	0,30	0,60	1,20	3,0	4,50	18	0,15	0,30	0,60	1,20	3,0	4,50	18
Dichlorodiphényl-trichloroéthane(D.D.T.)	-	-	25	Doses toxiques				-	-	0	Doses toxiques			
Dihydroxydiphényl-trichloroéthane	-	-	-	-	40	62	D.t	-	-	-	-	85	84	D.t.
Diethoxydiphényl-trichloroéthane	-	-	-	-	-	-	36	-	-	-	-	-	-	75
Dithymyl-trichloroéthane	0	24	45	-	71	100	-	0	24	84	-	90	100	-
Thymol	-	0	33	0	-	D.tox.		-	65	71	0	-	D.tox.	

TABLEAU X

ACTIVITE ANTHELMINTHIQUE DES DIFFERENTS COMPOSES ETUDIES SUR ASPICULURIS TETRAPTERA

	Pourcentage de déparasitation							Pourcentage de réduction						
Dose totale administrée (g/kg)	0,15	0,30	0,60	1,20	3,0	4,50	18	0,15	0,30	0,60	1,20	3,0	4,50	18
Dichlorodiphényl-trichloroéthane (D.D.T.)	-	-	0	Doses toxiques				-	-	46	Doses toxiques			
Dihydroxydiphényl-trichloroéthane	-	-	-	-	0	17	D.t	-	-	-	-	12	58	D.t
Diéthoxydiphényl-trichloroéthane	-	-	-	-	-	-	10	-	-	-	-	-	-	39
Dithymyl-trichloroéthane	0	0	9	-	57	66	-	39	36	72	-	95	96	-
Thymol	-	0	0	0	-	D.tox.		-	43	0	27	-	D.tox.	

L'expulsion complète de cet oxyuridé n'a pu être obtenue qu'avec le dithymyl-trichloroéthane : la dose de 4,50 g / kg, administrée en 6 jours nous a permis, en effet, de déparasiter tous les animaux en expérience. De plus, à partir de 0,60 g / kg (soit une dose journalière 40 fois plus faible que la dose minima mortelle), la réduction du nombre de vers est supérieure à 84 p. 100.

Le thymol est peu actif sur ce même parasite.

Aspiculuris tetraptera : le D.D.T. est pratiquement inactif. La présence de groupements hydroxyles libres ou éthérifiés ne s'accompagne que d'une très faible augmentation de l'activité.

Par contre, le dithymyl-trichloroéthane est beaucoup plus toxique à l'égard d'A. tetraptera : l'administration, pendant 6 jours, d'une dose quotidienne correspondant au 1/40ème de la dose minima mortelle permet d'expulser plus de 70 p. 100 de ces helminthes.

Le thymol expérimenté dans les mêmes conditions, ne provoque aucune déparasitation ni aucune réduction appréciable du nombre de vers.

Hymenolepis nana : seul le dithymyl-trichloroéthane manifeste une certaine activité à l'égard de ce parasite. Tous les autres composés, y compris le thymol, sont inactifs.

III

INTERET DU DITHYMYL-TRICHLOROETHANE

Les résultats obtenus avec le dithymyl-trichloroéthane mettent en évidence les profonds remaniements apportés à la pharmacologie du thymol lorsque deux molécules de ce composé sont unies par un pont trichloroéthane.

Le dithymyl-trichloroéthane présente, en effet, par rapport au thymol, non seulement une réduction très marquée de la toxicité, mais également une augmentation considérable des propriétés anthelminthiques sur les oxyuridés de la souris. De cet ensemble de faits résulte, à l'égard de S. obvelata un coefficient chimiothérapique satisfaisant (1/10).

Nos recherches bibliographiques nous ont amenés à comparer nos résultats à ceux obtenus par divers auteurs (6, 31, 52) qui ont testé "in vivo" sur A. tetraptera et S. obvelata plusieurs composés utilisés dans le traitement de l'oxyurose humaine. Nous avons ainsi constaté que des substances telles que le tétrachloréthylène, la phénothiazine et l'égressine qui ont donné de bons résultats dans les parasitoses à Enterobius vermicularis se sont montrées moins actives que le dithymyl-trichloroéthane sur les oxyuridés de la souris.

Ces remarques, s'ajoutant à la bonne tolérance du produit, permettent d'envisager une étude clinique du dithymyl-trichloroéthane chez l'homme.

CONCLUSIONS

La valeur anthelminthique de plusieurs dérivés du diphényl-méthane nous a amenés à étudier ce type de structure.

Tout d'abord, nous avons recherché dans la bibliographie les modifications influençant l'activité du diphényl-méthane. Puis, nous avons essayé de préciser l'intérêt de certains groupements susceptibles d'être introduits dans une telle molécule.

Ce travail nous a conduit aux constatations suivantes :

La présence d'un ou de plusieurs atomes de chlore sur un noyau aromatique semble engendrer des propriétés anthelminthiques élevées, tout particulièrement chez les composés de type diphényl-méthane. Cet intérêt du chlore se trouve confirmé, de manière plus générale, par les recherches que nous avons effectuées sur les hydrocarbures chlorés aliphatiques ; parmi ces composés, les dérivés chlorés du méthane et de l'éthane sont les plus intéressants.

Le manque de résultats significatifs ne permet pas, à notre connaissance, de déterminer s'il existe une position privilégiée du ou des radicaux hydroxyles sur les noyaux du diphényl-méthane. De même, aucun travail n'indique si la présence du groupement hydroxyle est nécessaire à l'activité de cet molécule. Cependant, l'intérêt des phénols en thérapeutique anthelminthique est connu de longue date ; parmi ceux-ci, nous avons étudié plus particulièrement le groupe des alkyl-métacrésols dont l'un des représentants, le thymol, est actif dans de nombreuses parasitoses.

Cet ensemble de faits nous a amenés à étudier expérimentalement plusieurs substances présentant, par rapport au diphényl-méthane, les modifications suivantes :

1°) Le radical CH_2 reliant les noyaux phényls est remplacé par un groupement trichloroéthane.

2°) Divers substituants sont fixés sur la partie phénylique : ce sont, respectivement, des atomes de chlore, des groupements hydroxyles libres, des groupements hydroxyles bloqués par éthérification, et les trois radicaux méthyle, hydroxyle et isopropyle caractéristiques de la molécule de thymol.

Ces substances sont :

le 4,4', dichlorodiphényl-trichloroéthane (ou D.D.T.)

le 4,4', dihydroxydiphényl-trichloroéthane,

le 4,4', diéthoxydiphényl-trichloroéthane,

le dithymyl-trichloroéthane.

Les trois derniers composés ont été synthétisés dans notre laboratoire.

Le thymol a également été étudié à titre de comparaison avec le dithymyl-trichloroéthane.

L'étude expérimentale de chacun de ces corps comporte plusieurs étapes :

Détermination de la toxicité aigüe.

Détermination de la toxicité chronique (effectuée uniquement pour les dérivés les plus intéressants).

Détermination de l'activité anthelminthique par des essais "in vivo" chez l'animal parasité. Nous avons utilisé la souris blanche parasitée spontanément par deux oxyuridés, Aspiculuris tetraptera et Syphacia obvelata, et par un Cestode, Hymenolepis nana.

De l'ensemble des résultats obtenus, nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

Le 4,4', dichlorodiphényl-trichloroéthane (D.D.T.), est inactif à l'égard des parasites envisagés et possède, de plus, une toxicité relativement élevée.

L'activité du 4,4', dihydroxydiphényl-trichloroéthane est faible pour Aspiculuris tetraptera, mais beaucoup plus marquée à l'égard de Syphacia obvelata ; cependant, aucune dose ne permet de déparasiter la totalité des souris. La toxicité de ce composé est faible.

Le 4,4', diéthoxydiphényl-trichloroéthane est peu actif sur les deux espèces d'oxyuridés et n'est pratiquement pas toxique.

Ces 3 composés sont sansaction sur Hymenolepis nana.

Ainsi, la substitution du chlore par des groupements hydroxyles, sur les noyaux phényls, a comme conséquence un accroissement de l'action anthelminthique. Le blocage de ces hydroxyles par des radicaux éthyles entraîne une réduction importante de l'activité.

Mais, de tous les corps étudiés, c'est le dithymyl-trichloroéthane qui manifeste les propriétés oxyuricides les plus marquées : son activité, faible à l'égard d'Hymenolepis nana, est, par contre, très élevée pour Aspiculuris tetraptera et plus encore pour Syphacia obvelata, parasite qu'il permet d'expulser en totalité. La toxicité négligeable du dithymyl-trichloroéthane pour l'hôte confère à ce composé un coefficient chimiothérapique satisfaisant (1/10).

Le thymol, expérimenté dans les mêmes conditions est inactif sur les trois parasites et sa toxicité sur la souris est six fois plus forte que celle du produit précédent.

Ainsi, le dithymyl-trichloroéthane manifeste, par rapport au thymol non seulement une réduction de la toxicité mais également une augmentation importante de l'activité ; cela permet d'envisager, pour ce corps, une étude clinique chez l'homme et d'espérer une application fructueuse en thérapeutique anthelminthique.

BIBLIOGRAPHIE

---

1. - BAILENGER J. - Coprologie parasitaire et fonctionnelle.
DROUILLARD imp. 1965.

2. - BAILENGER J. et JULES J. - Un nouvel anthelminthique : le thymolsulfonate de pipérazine. I - Etude expérimentale.
Bull. Soc. Pharm. de Bordeaux 1955, 93, 161-166.

3. - BALDWIN E. - A study of anthelmintic potency in relation to chemical constitution.
Brit. J. Pharmacol. 1948, 3, 91-107.

4. - BEHRENS B. et KAERBER G., in REGNIER J., LAMBIN S. et SZOLLDESI E. - De la détermination de la toxicité des substances médicamenteuses.
Bull. Soc. Pharmacol 1937, 39, 81-108.

5. - BEHRENS B. et KAERBER G., in QUEVAUVILLER A. - Comment détermine-t-on la toxicité d'une drogue pour l'animal de laboratoire ?
Pharmacie française 1948, 52, n° 4, 4-13.

6. - BROWN H.W., CHAN K.F. et FERRELL B.D. - A study of the activity of chemotherapeutic agents on infections of Syphacia obvelata and Aspiculuris tetraptera.
Exp. Parasitology 1954, 3, n° 1, 45-51.

7. - BRUMPT E. - Précis de Parasitologie. MASSON éd. 1949.

8. - BURCH G.R. et BLAIR H.E. - Vermiplex, an anthelmintic for cats.
North Amer. Vet. 1950, 31, 329-333.

9. - CAUJOLLE F. et FRANCK C. - Toxicité comparée du thymol et du carvacrol.
Bull. Soc. Chimie Biol. 1944, 26, 334-342.

10. - CAVIER R. - Acquisitions récentes dans la thérapeutique des helminthias intestinales.
Biol. Médic. 1960, 49, 201-261.

11. - CAVIER R. - Sur une nouvelle technique pharmacologique d'essai des taenifuges.
Ann. Pharm. Françaises 1956, 14, 545-552.

12. - CHAN K.F. - Chemotherapeutic studies on Syphacia obvelata infection in mice.
Amer. Journ. Hyg. 1952, 56, 22-30.

13. - CHUZABURO MANNAMI - Ascaricidal and local irritating actions of some halogenated diphenyls and resorcinol-alkyl-ethers.
Japan J. Pharm. Chem. 1951, 23, 384-386.

14. - COUNCIL ON PHARMACY AND CHEMISTRY. - Pharmacologic and toxicologic aspects of D.D.T. Journ. Amer. Med. Assoc. 1951, 145, 728-733.

15. - COUTELEN F., BIGUET J., OBEZ A. et LEFRANCOIS R. - Remarques sur l'emploi, contre l'oxyurose, de l'ester thymolique de l'acide N - isoamyl-carbamique.
Bull. Soc. Path. ex. 1952, 45, 465-469.

16. - CRAIGE A.H. et KLECKNER A.L. - Taeniacidal action of diphenthane - 70.
North Amer. Vet. 1946, 27, 26-30.

17. - DAUBNEY R. - Miscellaneous experiments with anthelmintics, chiefly alkyl-chlorides, in the treatment of nematode infestations of sheep.
Veterinary J. 1930, 86, 5-30.

18. - DESCHIENS R. - Etude d'un test de détermination des propriétés anthelminthiques des dérivés triphényl-méthaniques.
C.R. Soc. Biol. 1944, 138, 201-202.

19. - DESCHIENS R. - L'action anthelminthique des colorants triphényl-méthaniques.
Bull. Soc. Path. ex. 1944, 37, 111-125.

20. - DHINGRA D.R., KAPOOR S.N. et KACKER P.N. - J. Proc. Inst. Chemists 1953, 25, 171-173.

21. - DICKMANS. - J. Agric. Res. 1927, 35, 645.

22. - DUMAS J. - Les animaux de laboratoire. FLAMMARION éd. 1953.

23. - ENZIE F.D. - Methyl-chloroform as an anthelmintic.
Proc. Helm. Soc. Wash. 1945, 12, 24-26.

24. - ENZIE F.D. - Anthelmintic studies with some thymol-like compounds.
Proc. Helm. Soc. Wash. 1945, 12, 19-24.

25. - GODDARD R.F. et BROWN H.W. - Egressin, thymol derivative.
J. Pediatrics 1952, 40, 469-473.

26. - GRAEVE K. et HERRNRING G. - The use of gamma isomer of hexachlorocyclohexane as an anthelmintic.
Klin. Wochschr. 1949, 27, 318.

27. - GREENE A.E. - Chemical constitution and anthelmintic action.
Journ. Amer. Pharm. Assoc. 1931, 20, 20-26.

28. - HALL M.C. et FOSTER W.D. - Oil of chenopodium and chloroform as anthelmintics.
Journ. Amer. Med. Assoc. 1917, 68, 1961-1963.

29. - HALL M.C. - CCl_4 for the removal of parasitic worms, especially hookworms.
J. Agric. Res. 1921, 21, 157-175.

30. - HALL M.C. et SHILLINGER J. - Amer. J. trop. Med. 1925, 5, 229.

31. - HSIEH K.N. - The effect of the standard pinworm chemotherapeutic agents on the mouse pinworm A. tetraptera.
Amer. J. Hyg. 1952, 56, 287-293.

32. - JAGER E. - Uber eine Verbindung von Chloral mit Thymol.
Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft 1874, 7, 1197-1200.

33. - KERR K.B. - Hexachlorophene as an agent for the removal of Raillietina cesticillus.
Poultry Science 1948, 27, 781-788.

34. - KERR K.B. et CAVETT J.W. - A technic for initial evaluation of potential anthelmintics.
Exp. Parasitology 1952, 1, n° 2, 161-167.

35. - KERR K.B. et GREEN H.E. - Taeniacidal activity of seven halogenated diphenyl-methanes, a diphenyl-propane and a diphenyl-ether.
J. Parasit. 1953, 39, 79-83.

36. - KROTOV A.I. et BEKHLI A.F. - Investigation of new anthelmintics among phenols and their derivatives.
Farmakol. i. Toksikol. 1958, 21, n° 3, 49-53.

37. - KUDICKE R. et WEISE W. - Untersuchungen über die wurmtötenden Eigenschaften von Halogen verbindungen des Methans, Äthans und Äthylens.
Arch. f. Schiffs u. trop. Hyg. 1926, 30, 231-239.

38. - LAMSON P.D., BROWN H.W., WARD C.B., STOUGHTON R.W., HARWOOD P.D., BALTZLY R. et BASS A.D. - Anthelmintic studies on alkylhydroxybenzenes
J. Pharmacol. 1935, 53, 198-249.

39. - LAMSON P.D. et WARD C.B. - Anthelmintic properties of certain alkyl-cresols.
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 1931, 29, 340-341.

40. - LAUNOY L. - Pouvoir helminthologique et constitution chimique.
Biol. Med. 1938, 28, 349-384.

41. - LEBEAU P. et JANOT M.M. - Traité de Pharmacie chimique,
Masson éd. 1955-56.

42. - MAKSIC D. - D.D.T. as anthelmintic for horses.
Tierärztl. Umschau 1949, 4, 105-106.

43. - MEER E. - Uber die Verbindungen von Phenol mit Aldehyden.
Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft 1874, 7, 1200-1203.

44. - MIROSLAV PETRU. - Insecticides as anthelmintics : effets of some chemotherapeutics on worms in vitro.
Casopis Ceskeho Lekarnictva 1950, 63, 265-277.

45. - REBELLO S., GOMES DA COSTA S.F. et TOSCANO RICO J. - Action de quelques anthelminthiques sur les Cestodes, l'Ascaris et l'Ankylostome.
C.R. Soc. Biol. 1928, 1, 995.

46. - ROGERS. - Studies on the anthelmintic activity of hexyl-resorcinol and tetrachlorethylene.
Parasitology 1944, 36, 98-109.

47. - RYFF J.F., BROWNE J., STODDARD H.L. et HONESS R.F. - Removal of the fringed tape-worm from sheep.
J. Amer. Vet. Med. Ass. 1950, 117, 471-473.

48. - RYFF J.F., HONESS R.F. et STODDARD H.L. - Removal of the fringed tape worm from sheep.
J. Amer. Vet. Med. Ass. 1949, 115, 179-180.

49. - SAUER A. et WEISSFLUG I. - Klinische Prüfung des Egressin.
Schweiz. med. Wochschr. 1950, 28, 737.

50. - SCHNEIDER H.H. - Hexachlorocyclohexan als oxyurenmittel.
Klin. Woch. 1950, 28, 104.

51. - SMITH M.I., BAUER H., STOHLMAN E.F. et LILLIE R.D. - The pharmacologic action of certain analogues and derivatives of D.D.T.
J. Pharmacol. 1946, 88, 359-365.

52. - THOMPSON P.E. et REINERTSON J.W. - Chemotherapeutic studies of natural pinworm infections in mice.
Exp. Parasitology 1952, 1, n° 4, 384-391.

53. - VON OETTINGEN W.F. et SHARPLESS N.E. - The toxicity and toxic manifestations of D.D.T. as influenced by chemical changes in the molecule.
J. Pharmacol. 1946, 88, 400-413.

54. - WATKINS T.I. - The chemotherapy of helminthiasis.
J. Pharmacy and Pharmacol. 1958, 10, 209-225.

55. - WILLIAMS W.J., SCHELLING V. et HARTMANN F.W. - Action of some alkylhydroxybenzenes on pig ascaris in vitro.
Amer. J. Trop. Med. 1949, 29, 241-244.

56. - WRIGHT W.H. et SCHAFFER J.M. - Critical anthelmintic tests of chlorinated alkyl-hydrocarbons and a correlation between the anthelmintic efficacy, chemical structure and physical properties.
Amer. J. Hyg. 1932, 16, 325-428.

TABLE DES MATIERES

PAGES

INTRODUCTION..... 1

PREMIERE PARTIE

INTERET DE QUELQUES SUBSTITUTIONS
SUR LA MOLECULE DU DIPHENYL-METHANE.

I. - SUBSTITUTIONS PORTANT SUR LES NOYAUX
AROMATIQUES..... 4
A - Influence du chlore..... 4
B - Influence du groupement hydroxyle..... 6

II. - MODIFICATIONS PORTANT SUR LE GROUPEMENT CH_2
A - Influence de la longueur du radical hydrocarboné..... 7
B - Influence d'un substituant chloré..... 8

III. - HYPOTHESES DE TRAVAIL : ETUDE DE NOUVELLES SUBSTITUTIONS 9
A - Intérêt des noyaux phénoliques..... 9
B - Intérêt des hydrocarbures chlorés aliphatiques..... 14
C - Objet de la partie expérimentale..... 15

DEUXIEME PARTIE

METHODES ET TECHNIQUES D'ETUDE PHARMACOLOGIQUE.

I. - CONDITIONS D'UTILISATION DES PRODUITS ETUDIES..... 19

II. - DETERMINATION DE LA TOXICITE..... 19
A - Toxicité aigüe..... 19

PAGES

B - Toxicité chronique..... 20

III. - DETERMINATION DE L'ACTIVITE ANTHELMINTHIQUE..... 21

A - Méthode de DESCHIENS et ses modifications..... 21

B - Technique utilisée..... 22

TROISIEME PARTIE

ETUDE EXPERIMENTALE DU 4,4', DICHLORODIPHENYL-TRICHLOROETHANE. (D.D.T.)

I. - CARACTERES GENERAUX..... 26

II. - TOXICITE AIGUE..... 26

III. - ACTIVITE ANTHELMINTHIQUE..... 27

QUATRIEME PARTIE

ETUDE EXPERIMENTALE DU 4,4', DIHYDROXYDIPHENYL-TRICHLOROETHANE.

I. - CARACTERES GENERAUX..... 31

II. - SYNTHESE..... 31

III. - TOXICITE..... 32

A - Toxicité aigüe..... 32

B - Toxicité chronique..... 33

IV. - ACTIVITE ANTHELMINTHIQUE..... 39

CINQUIEME PARTIE

ETUDE EXPERIMENTALE DU 4,4', DIETHOXYDIPHENYL-TRICHLOROETHANE

I. - CARACTERES GENERAUX..... 44

II. - SYNTHESE..... 44

III. - TOXICITE AIGUE..... 45

IV. - ACTIVITE ANTHELMINTHIQUE..... 47

PAGES

SIXIEME PARTIE

ETUDE EXPERIMENTALE DU DITHYMYL-TRICHLOROETHANE.

I. - CARACTERES GENERAUX..... 50

II. - SYNTHESE..... 51

III. - TOXICITE..... 52

A - Toxicité aigüe..... 52

B - Toxicité chronique..... 54

IV. - ACTIVITE ANTHELMINTHIQUE..... 64

V. - COEFFICIENT CHIMIOTHERAPIQUE..... 70

VI. - ETUDE COMPAREE DU THYMOL..... 70

A - Toxicité aigüe..... 71

B - Activité anthelminthique..... 71

SEPTIEME PARTIE

SYNTHESE DES RESULTATS OBTENUS. ETUDE COMPARATIVE.

I. - TOXICITE..... 75

II. - ACTIVITE ANTHELMINTHIQUE..... 76

III. - INTERET DU DITHYMYL-TRICHLOROETHANE..... 79

CONCLUSIONS GENERALES..... 81

BIBLIOGRAPHIE..... 85